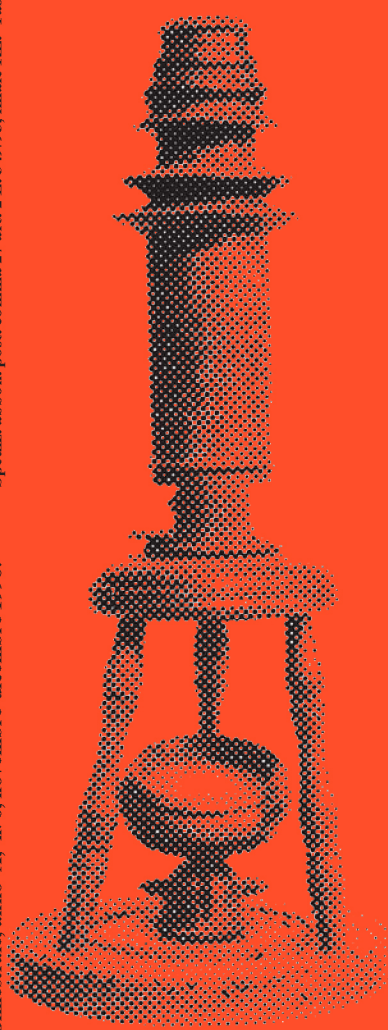
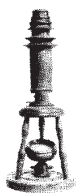
Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale

biologia ambientale

novembre
dicembre
1996

BOLLETTINO C.I.S.B.A.

Bimestrale, anno X, n. 6, novembre-dicembre 1996. Spediz. abbon. post. comma 27 art. 2 L. 549/95, filiale RE. Tassa pagata - Taxe perçue

METODI ANALITICI IRSA - CNR

Notiziario dei metodi analitici, suppl. al Quaderno n. 100

Saggio di tossicità acuta con batteri biolumine-scenti

Metodo per la valutazione della tossicità acuta con *Ceriodaphnia dubia*

Metodo per la valutazione della tossicità acuta con *Mysidopsis bahia*

Bollettino C.I.S.B.A. n. 6/1996

Autorizzazione del Tribunale di
Reggio Emilia n. 837 del 14 maggio 1993

proprietario
Paola Manzini
(Presidente del Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale)

direttore responsabile
Rossella Azzoni

REDAZIONE

Rossella Azzoni responsabile di redazione
Giuseppe Sansoni responsabile grafico
Roberto Spaggiari responsabile di segreteria

Numero chiuso in redazione il 20/12/1996

Il **C.I.S.B.A.** - Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale si propone di:

- divenire un punto di riferimento nazionale per la formazione e l'informazione sui temi di biologia ambientale, fornendo agli operatori pubblici uno strumento di documentazione, di aggiornamento e di collegamento con interlocutori qualificati
- favorire il collegamento fra il mondo della ricerca e quello applicativo, promuovendo i rapporti tecnico-scientifici con i Ministeri, il CNR, l'Università ed altri organismi pubblici e privati interessati allo studio ed alla gestione dell'ambiente
- orientare le linee di ricerca degli Istituti Scientifici del Paese e la didattica universitaria, facendo della biologia ambientale un tema di interesse nazionale
- favorire il recepimento dei principi e dei metodi della sorveglianza ecologica nelle normative regionali e nazionale concernenti la tutela ambientale.

Per iscriversi al **C.I.S.B.A.** o per informazioni scrivere al:
Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale,
via Amendola 2, 42100 Reggio Emilia
o telefonare al Segretario: *Roberto Spaggiari*
tel. 0522/295460 – 0338/6252618; fax 0522/295446

Quote annuali di iscrizione al Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale: socio ordinario: £ 70.000; socio collaboratore £ 50.000; socio sostenitore £ 600.000.
conto corrente postale n. 10833424 intestato a: CISBA, RE

I soci ricevono il bollettino ***Biologia Ambientale*** e vengono tempestivamente informati sui corsi di formazione e sulle altre iniziative del **C.I.S.B.A.**

Gli articoli originali e altri contributi vanno inviati alla Redazione:
Rossella Azzoni Gastaldi, via Cola di Rienzo, 26 - 20144 Milano.

I dattiloscritti, compreso il materiale illustrativo, saranno sottoposti a revisori per l'approvazione e non verranno restituiti, salvo specifica richiesta dell'Autore all'atto dell'invio del materiale.

Le opinioni espresse dagli Autori negli articoli firmati non rispecchiano necessariamente le posizioni del **C.I.S.B.A.**

Stampa ROTOPACK via Degola 7/A, REGGIO EMILIA

EDITORIALE

Come avrete immediatamente notato, questo numero di Biologia Ambientale riproduce integralmente un fascicolo del "Notiziario dei metodi analitici" dell'Istituto di Ricerca sulle Acque: è intenzione del Consiglio CISBA, infatti, dare la massima diffusione all'intera serie dedicata aia metodi biologici.

Tale scelta, oltre ad avere il chiaro fine di aggiornare i Soci, è finalizzata alla richiesta di pareri circa l'effettiva applicabilità di tali metodi nelle strutture pubbliche deputate al controllo ambientale.

Pur essendo stata richiesta la partecipazione del CISBA al Gruppo di Lavoro C.N.R. incaricato di predisporre metodi biologici per la tutela delle acque, infatti, i delegati assegnati ai vari sottogruppi hanno rilevato che le osservazioni connesse con le difficoltà organizzative sono state spesso trascurate e che, nel contempo, sono state lasciate irrisolte le questioni relative alla rappresentatività dei campioni saggiati.

Queste parole, che possono risultare eccessivamente dure, vogliono solamente esprimere il disagio del veder imbrigliata l'attività di laboratorio in un'ufficialità che potrebbe rendere inattuabile la maggior parte delle iniziative.

Attendiamo quindi, per ogni metodo, le vostre opinioni e speriamo che il nostro pessimismo venga sconfessato dalla vostra operosità.

SAGGI DI TOSSICITÀ

Metodi riprodotti dal Notiziario dei Metodi Analitici dell'Istituto di Ricerca sulle Acque (IRSA-CNR), suppl. al Quaderno n. 100

EDITORIALE IRSA

Il "Notiziario dei Metodi Analitici" propone, in questo quarto numero della nuova serie, tre metodi biologici per la determinazione della tossicità acuta che utilizzano rispettivamente un batterio bioluminescente, un crostaceo di acqua dolce e uno di acqua marina.

I metodi, frutto dell'attività del Gruppo di Lavoro incaricato di predisporre metodi biologici per la tutela delle acque, si aggiungono a quelli ufficiali già pubblicati e che utilizzano come organismi test il salmonide "Salmo gairdnerii", attualmente denominato "Onchorhynchus mykiss" ed il crostaceo "Daphnia magna".

I metodi proposti ampliano quindi in maniera significativa il ventaglio di possibilità di utilizzo di metodi per la valutazione della tossicità acuta e, in particolare, introducono un metodo per l'analisi di effluenti o acque superficiali ad elevato contenuto salino.

Si tratta di metodi ampiamente utilizzati in diverse nazioni; i metodi con crostacei, in particolare, sono da alcuni anni metodi ufficiali della normativa USA. Per quanto riguarda invece il territorio nazionale, questi metodi sono di recente acquisizione e pertanto è opportuno che gli utilizzatori e soprattutto gli enti preposti al controllo di qualità delle acque, facciano pervenire suggerimenti, proposte di modifica o quant'altro sia ritenuto utile a migliorare l'applicazione dei metodi stessi.

Al riguardo si sottolinea l'introduzione nel "Notiziario" di uno spazio "Osservazioni e quesiti" attraverso cui stabilire, in modo dialettico, un confronto tra gli utilizzatori dei metodi e la Redazione.

Il "Notiziario" si propone, in altri termini, di costituire sempre più il punto focale dell'analitica per le acque.

Per il raggiungimento di tale obiettivo è però necessaria la collaborazione più ampia possibile di tutti i soggetti interessati al problema. In particolare la comunità scientifica universitaria è invitata a collaborare attraverso l'invio di proposte di metodi, di suggerimenti relativi a miglioramenti operativi dei metodi esistenti, alla segnalazione di nuove procedure riportate dalla letteratura scientifica, etc.

Solo in questo modo sarà possibile fornire un prodotto utile e vitale che rappresenti un efficace strumento per il miglioramento e lo sviluppo di tecniche analitiche per il controllo ambientale.

Prof. Roberto Passino
Direttore dell'Istituto di Ricerca sulle Acque
Roma, giugno l996

SAGGIO DI TOSSICITÀ ACUTA CON BATTERI BIOLUMINESCENTI
(Metodo per la determinazione dell'inibizione della bioluminescenza emessa da *Vibrio fischeri*)

a cura di L. Guzzella, IRSA-CNR, Brugherio (Milano)

RIASSUNTO

Il saggio che utilizza il batterio bioluminescente *Vibrio fischeri* viene proposto per determinare gli effetti tossici a breve termine (15-30 minuti) di campioni d'acqua (superficiale, potabile o di scarico) o solidi (estratti e eluati di sedimenti e fanghi). Il saggio permette di calcolare per ciascun campione i valori di EC_{50}, EC_{20} o la diluizione di non effetto. Sono riportati nel metodo i risultati di un test di intercalibrazione condotto con alcune sostanze di riferimento.

SUMMARY

A standardized method for the determination of 15-30 min toxicity of *Vibrio fischeri* bioluminescent bacteria is evaluated. The proposed method can be applied for the analysis of liquid (superficial and drinking waters, eluates and wastes) and solid (sediments and muds) samples and permits the quantification of the EC_{50} and EC_{20} values and of the no-effective sample dilution. The results of a inter-laboratory ring test conducted with reference substances are illustrated

(*) Il metodo è stato discusso ed approvato da un sottogruppo dei Metodi Biologici composto da: Bielli E., Caldini G., Corsini ., Gaiter S., Garrou E., Giansanti P., Magnani T., Rampa P., Sbrilli G., Spaggiari R. e Guzzella L.

1 - INTRODUZIONE

1.1 - Obiettivo

Il metodo consente di valutare la tossicità acuta di campioni o estratti provenienti da corpi idrici d'acqua dolce, marina o salmastra utilizzando come risposta l'inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa dai batteri marini della specie *Vibrio fischeri*.

1.2 - Principio del metodo

La bioluminescenza emessa da una popolazione monospecifica di 10^6 cellule di batteri Gram-negativi appartenenti alla specie *Vibrio fischeri*, ceppo NRRL-B-11177, viene utilizzata per un saggio a 15-30 minuti per la determinazione dell'EC_{50}, dell'EC_{20} e della diluizione di non effetto.

1.3 - Campi di applicazione

Il metodo può essere utilizzato per valutare gli effetti tossici acuti di campioni di scarichi afferenti in acque dolci, salmastre, marine o a salinità superiore a quella di mare, di campioni d'acqua superficiale dolce, salmastra, marina o a salinità superiore a quella di mare, di eluati di fanghi, sedimenti o altri campioni solidi, di estratti di sedimenti (per la preparazione di eluati ed estratti si rimanda ad un metodo IRSA che sarà pubblicato successivamente) e di sostanze chimicamente definite.

1.4- Possibili interferenze

Sostanze volatili o scarsamente solubili in acqua, composti che possono reagire con l'acqua di diluizione del saggio o che si possono alterare durante le prove, possono influenzare l'attendibilità del risultato ottenuto.

Campioni colorati o torbidi possono interferire con la misura fotometrica della luce emessa dai batteri, invalidando l'analisi. Per saggiare campioni colorati o torbidi

occorre eseguire una prova preliminare utilizzando la cuvetta a camera doppia (cfr. appendice A).

Un'elevata umidità relativa dell'ambiente di laboratorio in cui viene effettuato il saggio può impedire la corretta lettura delle cuvette.

La presenza di cloro attivo, utilizzato per la disinfezione delle acque, può interferire con il risultato del saggio diminuendo la vitalità dei batteri. Tale interferenza può essere eliminata procedendo ad una neutralizzazione con tiosolfato (cfr. appendice B).

Valori di pH inferiori a 6 o superiori a 9, così come valori di salinità inferiori a 20‰ o superiori a 50‰ possono influire sulla sopravvivenza dei batteri, inibendone la naturale luminosità.

Nel caso di saggio con campioni d'acqua dolce, può essere utile impiegare come diluente una soluzione di saccarosio 200 g/L anziché ricorrere alla soluzione salina. Tale soluzione riproduce la pressione osmotica minima per la sopravvivenza del batterio. La sostituzione del saccarosio al cloruro sodico è consigliata quando per la natura stessa del campione (es. scarichi di industrie galvaniche, siderurgiche, meccaniche, elettroniche, chimiche, per la produzione di materie plastiche o catalizzatori, ecc.) o a causa di indagini precedentemente condotte, sia sospettata la presenza di elevate concentrazioni di metalli e/o ammoniaca.

2- REAGENTI E MATERIALI

2.1 - Organismo test e reperibilità

Per il saggio viene utilizzato il ceppo NRRL-B-11177 della specie marina *Vibrio fischeri* depositato presso il *DSM, Mascheroder Weg 16, 38124 Braunschweig, Germany* o presso l'*American Type Culture Collection, 12301 Parkiand Drive, Rockville, Maryland, U.S.A.* Il batterio può essere coltivato e conservato come descritto in appendice C oppure può essere acquistato come preparato commerciale. In tutti i casi devono essere rispettati, per ciascun lotto di batteri, i criteri di validazione riportati nel paragrafo 4.2.

2.2 - Reagenti e materiali

2.2.1 - Soluzione diluente

Sciogliere 20 g di sodio cloruro in 1 litro di acqua distillata. Aggiustare il pH a 7 ± 0,2 con sodio idrossido (NaOH) 1 M o con acido cloridrico (HCl) 1 M. Questa soluzione può essere conservata per quattro settimane a 4 °C ma il pH della soluzione deve sempre essere controllato e, se necessario, aggiustato ogni giorno al momento d'uso.

2.2.2 - Soluzione ricostituente

Per i batteri coltivati in laboratorio (cfr. Appendice C) si utilizza la seguente soluzione da sciogliere in agitazione per trenta minuti:

- 8 g di D(+)glucosio monoidrato ($C_6H_{12}0_6 \cdot H_2O$);
- 20 g di NaCl;
- 2,035 g di magnesio cloruro esaidrato ($MgCl_2 \cdot 6\,H_20$);
- 0,30 g di potassio cloruro (KCl);

in 1 litro di acqua distillata e si porta a pH 7 ± 0,2.

Questa soluzione può essere conservata a -20 °C per almeno tre mesi.

Per i batteri disponibili commercialmente deve essere garantita una concentrazione salina finale (sotto forma di NaCl) della sospensione del 2%, mentre si sconsiglia l'utilizzo di qualsiasi tipo di tampone che potrebbe, invece, interferire sul risultato dell'analisi.

2.3 - Strumentazione e vetreria

Per la conduzione del saggio sono necessari:

- congelatore per la conservazione delle colture batteriche a -20 °C;
- termostato per mantenere le cuvette del saggio a 15 ± 1 °C;
- bagno termostatico a 20 °C per riattivazione (opzionale);
- luminometro funzionante a 490 nm di lunghezza d'onda con una cella di misura termostatata a 15 ± 1 °C;
- pH-metro;
- cronometro;
- salinometro (opzionale);
- micropipetta a volume variabile da 10 a 200 µL e una da 200 a 5000 µL con adeguati puntali;
- appropriate cuvette di misura della luminescenza scelte in base alle caratteristiche del luminometro e di materiale chimicamente inerte.

Tutti gli accessori destinati a venire in contatto con la sospensione batterica non devono rilasciare sostanze tossiche.

3- PROCEDURA

3.1- Campionamento e preparazione del campione

Per quanto concerne il campionamento delle acque di scarico si rinvia alle metodiche previste dall'IRSA (IRSA,1995). Il volume di campione necessario per il saggio è di circa 10 mL. Si consiglia per eventuali ripetizioni, di riempire sino all'orlo con il campione d'acqua un contenitore da 100 mL in materiale chimicamente inerte (preferibilmente in vetro scuro).Tale procedura consente di evitare eventuali perdite di sostanze volatili presenti nel campione.

Il campione così prelevato deve essere conservato al buio e alla temperatura di 4 °C per non più di 72 ore. Per tempi maggiori si consiglia di congelare il campione a -20 °C; in quest'ultimo caso, tuttavia, non è possibile assicurare la totale conservabilità delle caratteristiche chimiche originali del campione ai fini del risultato del saggio tossicologico.

Prima di condurre il saggio si porta a temperatura ambiente il campione, si misura il pH e, in caso di campioni d'acqua di mare o salmastra, la salinità (IRSA, 1995). Nel caso che il valore del pH si collochi al di fuori dell'ambito di sopravvivenza dell'organismo (paragrafo 1.4) il saggio va eseguito sia al pH originale del campione, sia a pH 7,0 ± 0,2 previa aggiunta di NaOH e HCl 1 M. Nel caso invece che il pH del campione sia compreso tra 6 e 9 unità, non occorre modificare il pH.

Se il campione d'acqua è stato sottoposto a disinfezione, è necessario misurare la quantità di cloro attivo presente (cfr. appendice B).

Nel caso di campioni d'acqua dolce è necessario aggiungere al campione una quantità equivalente di NaCl tale da ottenere una salinità pari al 20‰. Quando necessario (paragrafo 1.4) il saggio va eseguito utilizzando il saccarosio invece del sale. Per campioni d'acqua di mare, salmastra o a salinità superiore a quella di mare non è necessario alterare la salinità del campione se questa si trova nell'ambito di sopravvivenza dell'organismo (paragrafo 1.4). Per campioni d'acqua di scarico afferenti in acque di mare, il saggio va condotto alla salinità del corpo recettore.

3.2 - Riattivazione della sospensione batterica

Le sospensioni congelate dei batteri, siano esse coltivate in laboratorio o acquistate, devono essere riattivate prima dell'uso, aggiungendo la soluzione ricostituente 2.2.2. La quantità da aggiungere può variare in considerazione della procedura del saggio, tenendo presente che la quantità di batteri nella cuvetta finale del saggio non deve comunque essere inferiore a 10^6 cellule per cuvetta. Dopo la riattivazione è necessario attendere circa 30 minuti prima di procedere al saggio. La sospensione batterica può essere utilizzata nelle 4-5 ore successive alla riattivazione o, comunque, finché siano rispettati i criteri di validazione riportati in 4.2. Se si conduce il test con una soluzione diluente in saccarosio (par. 1.4) anche i batteri devono essere riattivati nelle stesse condizioni.

3.3 - Procedure di conduzione del saggio

Varie procedure di conduzione possono essere adottate a seconda che sia noto (saggio definitivo) o no (saggio preliminare) l'ambito di concentrazioni entro cui ci si aspetta di rilevare l'effetto tossico dell'acqua di scarico o degli estratti da analizzare. Per campioni poco tossici o per corpi idrici superficiali si consiglia, invece, di adottare la procedura di saggio al 100%.

3.3.1 - Saggio preliminare

Quando sia ignota la tossicità del campione da analizzare occorre procedere saggiando un ampio intervallo di diluizioni. Si consiglia di saggiare, oltre alla soluzione di controllo (si utilizza la soluzione diluente 2.2.1), il campione tal quale e almeno quattro diluizioni successive 1:10 con la soluzione diluente 2.2.1, pari al 100%, 10%, 1%, 0,1% e 0,01% del campione. Si preparano le diluizioni nelle cuvette e si incubano le cuvette per circa 15 minuti a 15 °C. In altre cuvette, due per ciascuna diluizione, si preparano le soluzioni batteriche riattivate (500 µL) come descritto in 3.2. Si lasciano termostatare le cuvette con la sospensione batterica per circa 15 minuti e si misura l'intensità luminosa emessa dai batteri per ciascuna cuvetta con il luminometro. Tale misura viene indicata come I_0. Immediatamente dopo la determinazione dell'I_0 si aggiungono 500 µL di campione o di soluzione controllo alle cuvette. Il campione, venendo ad essere diluito 1:1 con la sospensione batterica, sarà quindi saggiato alle concentrazioni equivalenti a 50%, 5%, 0,5%, 0,05% e 0,005%. A 15 e 30 minuti dall'aggiunta del campione viene misurata per ciascuna cuvetta l'intensità luminosa emessa dai batteri. I valori ottenuti corrispondono rispettivamente all'I_{15} e all'I_{30} per ciascuna cuvetta. È necessario cronometrare il tempo intercorrente tra l'I_0 e l'I_{15} o l'I_{30} per ciascuna cuvetta in maniera da assicurare che sia mantenuto lo stesso tempo di esposizione per ciascuna cuvetta.

Al termine della prova è generalmente possibile individuare un ambito di concentrazioni entro cui procedere per il successivo saggio definitivo. Generalmente tale intervallo è compreso tra la concentrazione che causa la completa inibizione della luce emessa dal batterio e quella che non inibisce tale emissione.

3.3.2 - Saggio definitivo al 100%

Quando l'inibizione misurata nel saggio preliminare per il campione alla massima concentrazione (50% del campione) è inferiore al 50% o quando si preveda una bassa tossicità del campione (es. acque di superficie, acque sotterranee, acque potabili) è necessario ricorrere al saggio al 100%. In questo caso si consiglia di preparare cinque diluizioni successive (esempio 1:1,5) del campione a partire da quella al 100%. Le cinque diluizioni devono essere saggiate insieme alla soluzione di controllo in duplicato. A differenza del saggio preliminare, nel

saggio al 100% non è possibile misurare l'I_0 per ciascuna cuvetta, per cui si procede aggiungendo direttamente al campione (1 mL per ciascuna diluizione) una quantità molto contenuta di sospensione batterica (normalmente compresa tra 10-50 µL) in maniera da ridurre al minimo la diluizione del campione e si misura dopo 15 e 30 minuti rispettivamente l'I_{15} e l'I_{30} del campione, delle sue diluizioni e della soluzione di controllo.

Per migliorare la rilevanza statistica del saggio, il numero delle repliche e quello delle diluizioni utilizzate per ciascun campione può essere aumentato a piacere in base alle esigenze dell'operatore.

AVVERTENZE - Si consiglia di mescolare frequentemente la sospensione batterica prima dell'aggiunta al campione al fine di ottenere un'omogenea distribuzione dei batteri nelle cuvette.

3.3.3 - Saggio definitivo di tipo standard

Quando l'inibizione misurata nel test preliminare per il campione saggiato alla massima concentrazione (50% del campione) è superiore al 50% o quando sia noto l'intervallo di tossicità, è necessario condurre il saggio standard. Si preparano cinque diluizioni successive (esempio 1:2) del campione in base all'intervallo di tossicità noto e si saggiano tali diluizioni come nel saggio preliminare in duplicato insieme alla soluzione controllo.

Per migliorare la rilevanza statistica del saggio, il numero delle repliche e quello delle diluizioni utilizzate per ciascun campione può essere aumentato a piacere in base alle esigenze dell'operatore.

4- RISULTATI

4.1 - ELABORAZIONE DEI RISULTATI

Nell'elaborazione dei risultati occorre calcolare il fattore di correzione dei valori di I_0. Il fattore (f_{kt}) si calcola in base alla risposta della soluzione di controllo come:

$$f_{kt} = I_{kt} / I_0 \qquad (t = 15 \text{ o } 30 \text{ minuti})$$

dove I_{kt} è l'intensità luminosa dei batteri misurata dopo l'aggiunta della soluzione di controllo a 15 o 30 minuti mentre I_0 è l'intensità luminosa prima dell'aggiunta della stessa soluzione. Si calcola la media dei fattori di correzione per le due repliche del controllo e si calcolano per ciascuna cuvetta i nuovi valori di I_0 corretti per il fattore f_{kt} nel seguente modo:

$$I_{ct} = I_0 \cdot f_{kt}$$

Nel caso del saggio al 100%, non essendo stati misurati i valori di I_0 per ciascuna cuvetta non viene eseguita alcuna correzione rispetto alle variazioni temporali della luminescenza emessa dalla soluzione di controllo.

Per il saggio standard l'inibizione percentuale di ciascuna diluizione (H_t) del campione si calcola come segue:

$$H_t = \frac{I_{ct} \cdot I_{Tt}}{I_{ct}} \cdot 100$$

dove i valori di I_{ct} derivano dalla precedente equazione mentre quelli di I_{Tt} rappresentano i valori di intensità luminosa a 15 o 30 minuti delle cuvette dopo l'aggiunta del campione e delle sue diluizioni.

Si calcolano le medie delle inibizioni percentuali delle repliche di ciascuna diluizione del campione e i coefficienti di variazione tra le repliche. Per il saggio al 100% l'inibizione percentuale di ciascun campione e delle sue diluizioni si calcola così:

$$H_t = \frac{I_{Tt}}{I_0} \cdot 100$$

4.1.1 - Calcolo diluizione di non effetto

Il calcolo della diluizione di non effetto viene condotto solamente nel caso di campioni di acque di scarico e comunque non è sostitutivo del calcolo dell'EC_{50}. Il calcolo del G_L è eseguito a partire dai valori di inibizione percentuale misurati a 30 minuti per ciascuna diluizione del campione. Si considera diluizione di non effetto la più elevata tra quelle saggiate che determina una inibizione luminosa inferiore al 20%. Il valore reciproco della diluizione di non effetto rappresenta il valore di G_L per ciascun campione (esempio diluizione 1:4, $G_L = 4$).

4.1.2 - Calcolo EC_{50} ed EC_{20}

Per il calcolo delle EC_{50} ed EC_{20} occorre trasformare i valori di inibizione percentuale (H_t) in valori gamma (Γ_t) con la seguente equazione:

$$\Gamma_t = \frac{H_t}{100 - H_t}$$

Normalmente vengono utilizzati per le successive elaborazioni soltanto i valori di H_t compresi tra 10 e 90%

I valori Γ_t così ottenuti vengono messi in relazione con le concentrazioni di campione analizzate (c_t) con la seguente equazione:

$$\log c_t = b \log \Gamma_t + \log a$$

dove *b* rappresenta la pendenza della curva di tossicità e *a*

l'intercetta con l'asse delle ordinate.

Con il metodo statistico dei minimi quadrati è possibile calcolare i valori di EC_{20} ed EC_{50} con i relativi limiti di confidenza, che corrispondono a valori di Γ_t pari a 0,25 e 1 rispettivamente.

Il calcolo di EC_{20} è richiesto nei casi in cui non sia possibile determinare il valore di EC_{50}, mentre si definisce non tossico il campione che, saggiato con il test definitivo al 100%, determina alla massima concentrazione considerata un'inibizione inferiore al 20%.

4.2 - Criteri di validazione

La verifica delle condizioni sperimentali relative a ciascun batch o lotto di batteri va effettuata ricorrendo a tre composti di riferimento: 3,5 diclorofenolo, bicromato di potassio e solfato di zinco, ottenendo i seguenti risultati:

- 30min EC_{50} per il 3,5 diclorofenolo inferiore a 6 mg/L;
- 30min EC_{50} per il $K_2Cr_20_7$ espresso come Cr^{VI} inferiore a 24 mg/L;
- 30min EC_{50} per il $ZnSO_4{\cdot}7H_2O$ espresso come Zn^{II} inferiore a 28 mg/L.

Inoltre, il valore di f_{kt} per esposizioni sia a 15 che a 30 minuti deve essere compreso tra 0,7 e 1,4 e i coefficienti di variazione tra le repliche non devono essere superiori al 10%.

Il saggio di ciascun campione deve essere inoltre validato verificando l'effetto di inibizione della bioluminescenza del 3,5 diclorofenolo.

4.3 - Risultati del saggio

Il risultato finale condotto con il presente metodo deve contenere informazioni relative a:

- identità del campione con dati sul campionamento (data, ora, luogo, tipologia del campione), sul tempo di stoccaggio in laboratorio;
- pH e salinità naturale del campione ed eventuali modificazioni apportate;
- data di esecuzione del saggio e nome dell'operatore;
- indicazioni relative a eventuale pretrattamento del campione (per esempio correzione per cloro attivo totale, filtrazione, centrifugazione, diluizione);
- origine dei batteri utilizzati ed eventuali indicazioni della data di preparazione o del numero di lotto;
- tipo di procedura utilizzata nel saggio e risultati delle analisi;
- elaborazioni dei risultati espresse come EC_{50}, EC_{20} o G_L;
- risultati dei test con sostanze di riferimento.

APPENDICE A
Test con campioni torbidi o colorati

Per campioni torbidi o colorati (soprattutto di colore rosso, giallo o blu) si rende necessario il controllo della luminescenza emessa dai batteri senza che questi vengano a contatto con il campione. Ciò è possibile utilizzando una cuvetta a doppia camera. Nella camera interna viene posta una quantità nota di soluzione batterica (generalmente 0,2 mL o comunque una quantità tale da riempirla) mentre nella camera esterna si aggiunge la soluzione di controllo (1 mL); si attende 5-10 minuti e si misura la luminescenza emessa dai batteri. Successivamente viene sostituita nella camera esterna la soluzione di controllo con il campione da saggiare (1 mL), si misura quindi la luminescenza batterica. L'eventuale inibizione misurata permette il calcolo del fattore di correzione da adottare nel calcolo dell'EC_{50}, dell'EC_{20} o della diluizione di non effetto. Si considerano significative inibizioni superiori al 10%, mentre inibizioni superiori al 50% normalmente impediscono una corretta elaborazione dei risultati. Per il calcolo del fattore di correzione si rimanda a software di elaborazione dati già esistenti (Microtox Software Program 7.11 oppure LUMISsoftII).

Nel caso del saggio preliminare o di quello al 100% il campione viene analizzato alla massima concentrazione saggiata. Nel caso del metodo standard viene analizzata soltanto la concentrazione di campione che si avvicina maggiormente al valore di EC_{50} o di EC_{20} a seconda dell'effetto che si intende considerare.

Nel caso di campioni molto torbidi si consiglia di centrifugare o filtrare il campione prima dell'analisi.

APPENDICE B
Neutralizzazione del cloro attivo totale con tiosolfato

In presenza di cloro libero si può provvedere alla sua titolazione (IRSA, 1995) e alla conseguente inattivazione, calcolando i millilitri di una soluzione a titolo noto di tiosolfato pentaidrato da aggiungere ad un volume prestabilito dell'acqua in esame, mediante la seguente equazione:

$$\text{mL di tiosolfato} = \frac{(\text{mL di scarico}) \cdot (F) \cdot (\text{conc. di } Cl_2)}{(\text{conc. di tiosolfato})}$$

dove:
mL di tiosolfato = mL della soluzione a titolo noto da aggiungere all'acqua di scarico;
F = 6,7 per il tiosolfato anidro e 10,52 per quello pentaidrato;
conc. di Cl_2 = concentrazione del cloro attivo totale pre-

sente nell'acqua di scarico espressa in mg/L;
conc. di tiosolfato = concentrazione di tiosolfato espressa in mg/L.

Il titolo del tiosolfato deve essere controllato ogni 15 giorni.

APPENDICE C
Metodo per la coltura di batteri bioluminescenti in laboratorio

Strumentazione richiesta oltre a quella già prevista dal saggio:
- autoclave per sterilizzazione vetreria e mezzi di coltura;
- centrifuga refrigerata;
- agitatore magnetico;
- incubatore ad agitazione continua;
- fotometro o spettrofotometro per misure a 578 nm di lunghezza d'onda.

Per la coltura dei batteri utilizzati nel test, distribuire 0,1 mL di una sospensione di 10^6 cellule del ceppo *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177 sulla superficie di una piastra Petri sterile contenente il terreno solido (C.2). Spatolare il terreno e incubare la piastra a 20 °C per 2-5 giorni. A crescita delle colonie avvenuta, osservare la piastra al buio e contrassegnare le colonie luminescenti. Trasferire ciascuna colonia contrassegnata su una nuova piastra di terreno solido e strisciare. Incubare come sopra descritto e isolare nuovamente le colonie luminescenti. Tale procedura di isolamento si rende necessaria in quanto la sospensione di partenza potrebbe essere stata confezionata in condizioni di non sterilità.

Inoculare quindi in condizioni di sterilità una singola colonia isolata in 50 mL di terreno liquido (C.1) (coltura primaria). Incubare sotto agitazione (preferibilmente con agitatore magnetico) a 20 ± 1 °C per 20 ± 1 ore a 180 rpm. Al termine del periodo di incubazione prelevare in sterilità 1 mL di soluzione colturale e diluirlo con 9 mL di soluzione di cloruro di sodio 20 g/L in acqua distillata e misurare la torbidità in FAU a 578 nm secondo la norma ISO 7027-1984 (cfr. C. 4).

Inoculare quindi in 50 mL di terreno liquido un volume di coltura primaria tale che la torbidità iniziale sia pari a 10 FAU. Incubare sotto agitazione a 20 ± 1 °C per 20±1 ore. Al termine del periodo di incubazione misurare la torbidità della coltura diluita 1/10. Il valore atteso dovrebbe essere compreso tra 700 e 1800 FAU per la coltura non diluita.

Raffreddare quindi in un bagno freddo una soluzione con cloruro di sodio al 2% in acqua distillata e il mezzo di conservazione (cfr. C.3). Centrifugare la brodocoltura in centrifuga refrigerata a 4 ± 2 °C per 15-20 minuti a 6000 ± 2000 G. Decantare il surnatante e riprendere il residuo con 5-10 mL della soluzione di cloruro di sodio fredda. Centrifugare come prima. Decantare il surnatante, risospendere il residuo con 0,5 mL della soluzione di cloruro di sodio trasferendo la sospensione in un beaker freddo da 100 mL e porre in bagno freddo. Aggiungere lentamente agitando 4 mL di mezzo di conservazione (C.3). Diluire 1/100 una aliquota di 100 µL e misurare la torbidità come precedentemente descritto. Aggiungere un volume di mezzo di conservazione tale che la torbidità definitiva prevista sia compresa tra 2000 e 3000 FAU. Il volume complessivo di mezzo di conservazione da aggiungere non deve, comunque, essere inferiore a 5 mL.

Mantenere la sospensione in bagno freddo ancora per 15 minuti. Distribuire aliquote di 100 µL in provette munite di tappo. Congelare a -20 o a -80 °C.

La stabilità dei batteri preparati è di almeno un mese a -20 °C e di sei mesi a -80 °C.

Per evitare alterazioni genetiche del ceppo è bene preparare nuove colture ogni sei mesi.

C.1 - Terreno liquido

Il terreno liquido si prepara sciogliendo in acqua distillata:
- 30 g di NaCl;
- 6,1 g di fosfato monosodico monoidrato ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$);
- 2,75 g di fosfato bipotassico triidrato ($K_2HPO_4 \cdot 3 H_20$);
- 0,204 g di magnesio solfato eptaidrato ($MgS0_4 \cdot 7 H_2O$);
- 0,5 g di fosfato biammonico ($(NH_4)_2HPO_4$);
- 3 mL di glicerolo;
- 5 g peptone di caseina;
- 0,5 g di estratto di lievito.

Si porta la soluzione ad 1 litro con acqua distillata e si aggiusta il pH a 7,2 ± 0,2 con NaOH 1 M o HCl 1 M.

Si suddivide la soluzione in aliquote da 50 mL in beute da 250 mL e si sterilizza in autoclave a 121 °C per 20 minuti.

C.2 - Terreno solido

Il terreno solido si prepara impiegando la stessa soluzione del terreno liquido allo stesso pH, ma aggiungendo 12 g di agar per litro. Il terreno, contenente l'agar aggiunto a freddo, va sciolto a caldo, autoclavato e distribuito su piastre Petri sterili.

C.3 - Mezzo di conservazione

Il mezzo si prepara sciogliendo a 37 °C in agitazione:

- 60 g di D(+)-glucosio ($C_6H_{12}0_6$);
- 4 g di cloruro di sodio (NaCl);
- 2 g di L-istidina;
- 0,5 g di sieroalbumina (BSA).

Se necessario, si aggiusta la soluzione a pH 7,2 ± 0,2 con NaOH 1M o HCl 1M. Si porta a 100 mL con acqua distillata. La soluzione non può essere conservata, per cui si consiglia di prepararla fresca, ogni volta prima dell'uso.

C.4- Determinazione fotometrica della torbidità secondo ISO 7027-1984

Apparecchiatura: fotometro e spettrofotometro per misure a 578 nm.

Reagenti:

Soluzione A: esametilentetramina 10 g/100 mL di acqua distillata

Soluzione B: idrazina solfato 1 g/100 mL in acqua distillata.

Metodo: in un matraccio tarato da 100 mL unire 5 mL di soluzione A con 5 mL di soluzione B. Lasciare per 24 ore a temperatura ambiente e portare a volume con acqua. La torbidità della sospensione di formazina così preparata è di 400 unità di attenuazione-formazina (FAU). Diluire opportunamente in acqua tale standard in modo da ottenere sospensioni il cui valore di torbidità sia 10, 50, 100 e 200 FAU. Misurare l'assorbanza di ciascuna soluzione a 578 nm e tracciare una curva di taratura da utilizzare per le misure di torbidità della sospensione batterica.

APPENDICE D
Risultati del test di intercalibrazione

L'Istituto di Ricerca sulle acque ha condotto nel 1994 un test di intercalibrazione utilizzando per il saggio due sistemi disponibili commercialmente: il MICROTOX fornito dalla Microbics (Carisbad, California, USA) e il LUMISTox fornito dalla Dr. Lange (Dusseldorf, Germania). I laboratori che hanno partecipato al test sono i seguenti:

per il MICROTOX
SMPA, USL 8 - Pistoia (Dr. A. Corsini);
LSP, USSL 24 - Grugliasco, TO
(Dr. E. Garrou, Sig. P. Giansanti);
PMIP, USSL 47 - Mantova (Dr. T. Magnani);
SMPA, USL 25 - Piombino (Dr. G. Sbrilli);
PMP, USL Reggio Emilia (Dr. R. Spaggiari);
PMP, USL 3 - Genova (Dr. S. Gaiter);
SMPA, USL 10/A- Firenze (Dr. G. Caldini);

per il LUMISTox
LSP, USL 51 - Novara (Dr. E. Bielli);
LSP, USL Torino I (Dr. P. Rampa);
IRSA, CNR - Brugherio (Ml) (Dr. L. Guzzella).

Tab. 1.

Codice Laboratorio	Metodica	3,5 diclorofenolo		cromo^{VI}		zinco^{II}	
		media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.
A	Microtox	2,51	0,06	21,06	1,31	0,44	0,04
B	Microtox	1,93	0,07	13,06	0,31	0,72	0,02
C	Microtox	2,68	0,13	21,07	2,29	0,61	0,12
D	Microtox	3,11	0,12	14,09	0,58	0,59	0,16
E	Microtox	1,79	0,09	18,45	2,81	0,51	0,04
F	Microtox	4,01	0,23	25,90	4,23	0,37	0,05
F	Microtox-lavat.	3,45	0,26	13,18	0,56	0,27	0,01
G	Lumistox+hepes	5,07	0,24	5,21	0,26	28,33	0,97
G	Lumistox-hepes	4,47	0,29	3,47	0,1	19,47	0,42
G	Lumistox-prep. lab.	3,69	0,11	3,73	0,18	9,18	0,09
H	Lumistox+hepes	3,92	0,30	4,83	0,28	22,34	1,64
H	Lumistox-hepes	4,65	0,39	4,12	0,2	21,21	1,71
H	Lumitox+tamp.fosf.	4,84	0,60	19,27	0,9	0,62	0,03
I	Lumistox+hepes	4,50	0,57	4,59	0,56	18,24	0,34
I	Lumistox-hepes	3,99	0,07	6,27	0,69	17,74	2,70

Tab. 2.

Laboratori totali	Metodica	3,5 diclorofenolo		cromo^{VI}		zinco^{II}	
		media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.
5	Microtox	2,63	0,81	19,00	4,8	0,49	0,12
1	Microtox-lavat.	3,45	0,26	13,18	0,56	0,27	0,01
3	Lumistox+hepes	4,52	0,59	4,90	0,43	23,3	4,4
3	Lumistox+hepes	4,37	0,39	4,5	1,25	19,6	2,17
1	Lumistox+tamp.fosf.	4,84	0,60	19,27	0,9	0,62	0,03
1	Lumistox-prep.lab.	3,69	0,11	3,73	0,18	9,18	0,09

Sono state utilizzate quali sostanze test il 3,5 diclorofenolo, il bicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$) e il solfato di zinco ($ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$). Per ciascuna di queste sostanze è stata determinata l'EC_{50} a 30 minuti utilizzando le seguenti concentrazioni (mg/L):

	MICROTOX	LUMISTox
3,5 diclorofenolo	10-5-2,5-1,25	10-5-2,5-1,25
$K_2Cr_2O_7$ come Cr ^{VI}	20-10-5-2,5	10-5-2,5-1,5
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ come Zn^{II}	2,5-1,25-0,62-0,31	40-20-10-5

Ciascuna concentrazione è stata saggiata conducendo da un minimo di tre ad un massimo di sei repliche; mediamente sono state condotte cinque repliche per concentrazione. Ciascuna replica è stata elaborata separatamente al fine di ottenere per ciascun laboratorio un valore medio di EC_{50} a 30 minuti. Il saggio è stato condotto seguendo la metodica qui riportata con alcune variazioni. Per il Microtox è stata condotta anche una prova lavando, dopo riattivazione, per tre volte i batteri con la soluzione ricostituente (2.2.2) e centrifugando la sospensione in centrifuga refrigerata a 5 °C per 30 minuti. Tale operazione è stata condotta per allontanare dalla sospensione batterica eventuali residui di mezzo colturale. Per il LUMIStox il test è stato condotto seguendo: a) la metodica DIN 38412 teil 341; b) utilizzando per la riattivazione la soluzione 2.2.2 che, a differenza di quella prevista dalla metodica DIN, non contiene il tampone biologico HEPES; c) utilizzando per la riattivazione una soluzione senza l'HEPES ma con tampone fosfato così come viene utilizzata per le metodiche AFNOR T90-320 e NVN 6516. È stata infine condotta una prova con i batteri preparati in laboratorio. I risultati sono mostrati in dettaglio nella tab. 1 e riassunti nella tab. 2.

BIBLIOGRAFIA

IRSA (1995). Metodi analitici per le acque. *Quad. Ist. Ric. Acque*, 100, 342 pp.

METODO PER LA VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ ACUTA CON *Ceriodaphnia dubia*(*)

a cura di L. Viganò, IRSA-CNR, Brugherio (Milano)

RIASSUNTO

In questo documento sono descritte delle procedure standardizzate per condurre dei saggi di tossicità acuta con il crostaceo d'acqua dolce *Ceriodaphnia dubia*. I saggi descritti permettono di valutare se effluenti di scarico o acque superficiali contengono sostanze tossiche a concentrazioni capaci di effetti tossici i quali sono misurati ed espressi come concentrazione letale per il 50% degli organismi (LC_{50}). In appendice sono dettagliate le condizioni colturali necessarie al mantenimento del crostaceo i cui neonati vengono utilizzati per la conduzione dei saggi.

SUMMARY

In this document standardized methods are described to undertake acute toxicity tests with the freshwater crustacean *Ceriodaphnia dubia*. Procedures are outlined to assess whether toxic chemicals are present at toxic concentrations in effluents and receiving waters and measured toxicity is usually reported in terms of concentration which is lethal to 50% of the organisms (LC_{50}). Included as an appendix are instructions on culturing conditions and requirements of the crustacean whose neonates are used to perform the tests.

(*) Il metodo è stato discusso ed approvato dal sottogruppo "Metodi con Crostacei" del Gruppo Metodi Biologici composto da: Amodei M., Bacci E., Baudo R., Buffagni M., De Marco M., Ferraro M., Marchetti R., Marchini S., Pasini M., Rampa P., Sbrilli G. e Viganò L.

1 - INTRODUZIONE

Il metodo descrive la procedura con la quale indagare se effluenti di scarico o acque superficiali contengono inquinanti a concentrazioni tali da causare effetti tossici acuti sul crostaceo d'acqua dolce *Ceriodaphnia dubia*. La mancata osservazione di effetti tossici acuti per un dato campione non esclude che essi si manifestino saggiando campioni prelevati in altri momenti, e ciò in dipendenza della variabilità dello scarico o del corpo idrico superficiale. Si tenga presente, inoltre, che l'assenza degli effetti tossici che si manifestano a breve termine (acuti) non preclude che lo stesso corpo idrico o lo stesso effluente di scarico possano causare quegli effetti tossici che si manifestano invece solo dopo esposizione prolungata (cronici).

2- GENERALITÀ SUL METODO

In questo tipo di saggio giovani individui di *Ceriodaphnia dubia* sono esposti per un tempo massimo di 48 h (eventualmente prolungabile a 96 h) a campioni dei quali si voglia misurare la tossicità acuta. Generalmente, un campione di acqua di scarico è saggiato ad almeno 5 diluizioni, a ciascuna delle quali è esposto un numero definito di giovani organismi. Elaborando i dati di mortalità, osservati alle diverse diluizioni, è possibile ottenere per un dato campione il valore di diluizione letale per il 50 % degli individui (LC_{50}) per il tempo di esposizione prescelto. Una procedura analoga è applicabile allo studio degli effetti tossici acuti delle acque dei corpi idrici; tuttavia, è raro che in questo caso le concentrazioni degli inquinanti raggiungano livelli tali da permettere l'osservazione di effetti superiori al 50 % di mortalità. Molto più spesso l'esame di un corpo idrico si limita a valutare la significatività statistica di pochi eventuali decessi osservati per esposizione di *C. dubia* ad un campione non diluito.

Si tenga presente che il metodo basato sull'uso di questo stesso crostaceo ma destinato alla stima della tossicità cronica (7 giorni), può consentire anche la valutazione della tossicità acuta, a patto che le diluizioni del campione da saggiare coprano un intervallo di valori sufficientemente ampio. Si raccomanda, di conseguenza, di privilegiare l'applicazione del saggio a 7 giorni ogni qualvolta sia possibile.

Nel caso si voglia esaminare la relazione esistente tra la tossicità acuta e quella cronica di un effluente o di un corpo idrico, i due dati di tossicità dovranno essere prodotti nelle stesse condizioni sperimentali e, cioè, quelle del saggio cronico (7 giorni).

3 - CONDUZIONE DEL SAGGIO

3.1 - Materiali e strumentazione

La conduzione del saggio di tossicità richiede:

- un minimo di 12 contenitori del tipo beaker in vetro borosilicato con volume utile di 30 mL. Numerosi laboratori usano con successo dei contenitori "a perdere", in polistirene, che sono normalmente commercializzati per alimenti;
- sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro con un temporizzatore per il controllo del fotoperiodo e possibilmente un dispositivo che simuli la transizione graduale tra le fasi di luce e di buio;
- dispositivo per il controllo della temperatura delle diluizioni da saggiare nell'ambito di 20 ± 1 °C e 25 ± 1 °C per tutta la durata della sperimentazione;
- analizzatore di ossigeno disciolto con sensore di dimensioni adeguate alla misura nei contenitori di saggio;
- microscopio binoculare da dissezione, provvisto di illuminazione laterale;
- fonte di aria compressa a bassa pressione, con cannule in vetro o pipette pasteur per far gorgogliare l'aria nelle soluzioni da aerare. L'applicazione di un piccolo compressore del tipo usato in acquariologia, può costituire una soluzione adeguata. L'aria distribuita dai grossi impianti centralizzati è spesso contaminata da vapori di oli o altri inquinanti che vanno rimossi con opportuni dispositivi di filtrazione.

3.2 - Organismi per il saggio

La specie utilizzata in questo saggio di tossicità è il crostaceo cladocero *Ceriodaphnia dubia* che è allevato in laboratorio seguendo le indicazioni fornite in Appendice A2. Il saggio è allestito con i neonati appartenenti alla terza schiusa o alle successive, prodotte da femmine mantenute in condizioni di allevamento controllate e rispondenti ai requisiti di buone condizioni colturali descritti in Appendice. I giovani organismi da utilizzare sono quelli schiusi entro e non oltre le 24 h precedenti l'allestimento della prova.

3.3 - Acqua di diluizione

Generalmente, le diverse diluizioni del campione da saggiare sono preparate usando come acqua di diluizione e controllo la stessa in cui sono allevati i riproduttori. Tuttavia, in funzione delle finalità del saggio è opportuno distinguere tra diverse possibili soluzioni:

a) Se lo scopo è di evidenziare la presenza di effetti tossici acuti e il loro andamento nel tempo o di confrontare la tossicità di diversi effluenti, come diluente si adotterà un'acqua sintetica (standard), avente durezza di circa 150 mg/L $CaCO_3$ per la cui preparazione si aggiungono dei sali di grado analitico ad acqua Milli-Q® o deionizzata di qualità equivalente.
Per preparare 1 L di acqua standard, i sali ed i quantitativi da aggiungere sono nell'ordine, i seguenti: 10 mg di KCl, 192 mg di $NaHCO_3$, 53 mg di $MgSO_4$ e 183 mg di $CaSO_4 \cdot 2H_2O$. La soluzione risultante ha durezza compresa nell'ambito 140-160 mg $CaCO_3$/L, alcalinità 110-120 mg $CaCO_3$/L, e pH 7,5-8,5. L'acqua standard può anche essere preparata a partire da un'acqua minerale, scelta tra quelle disponibili in commercio, preferibilmente la stessa eventualmente usata per allevare l'organismo, e adeguata, se necessario, nelle concentrazioni di alcuni costituenti maggiori a dare i valori di durezza e alcalinità indicati (cfr. Appendice A3).

b) Se lo scopo del saggio è di valutare la tossicità acuta determinata dall'immissione di uno scarico nelle acque del recettore, come diluente si userà l'acqua non contaminata di quest'ultimo, prelevata a monte dell'immissione o comunque al di fuori dell'area esposta a fonti di contaminazione. Nel caso essa non sia disponibile, si può utilizzare un'acqua prelevata da un altro corpo idrico superficiale o un'acqua sintetica (cfr. "punto a") aventi approssimativamente le stesse caratteristiche chimiche e, in particolare, la stessa durezza del corpo idrico recettore oggetto del controllo. In qualche caso è anche possibile operare modificando la composizione di un'acqua naturale, purché di qualità adeguata, previa aggiunta di sali (reagenti di grado analitico) e nelle quantità necessarie. Il prelievo di acque naturali deve essere effettuato immediatamente prima del loro impiego e comunque non oltre le 96 h dallo stesso, mantenendo refrigerati i campioni (4 °C) quando se ne faccia uso a più di 24 h dalla raccolta.

c) Se, infine, lo scopo del saggio è quello di esaminare

gli eventuali effetti additivi o comunque le interazioni tra i contaminanti presenti nello scarico e quelli veicolati dal recettore, come acqua di diluizione si userà quella del recettore stesso, indipendentemente dal suo grado di contaminazione, prelevata a monte o al di fuori dell'influenza dello scarico in esame. In questo caso è necessario aggiungere un gruppo di organismi di controllo esposti alla sola acqua di allevamento (cfr. Appendice A3).

3.4 - Illuminazione

Gli organismi esposti ai campioni da saggiare sono mantenuti alle stesse condizioni di illuminazione a cui sono allevati. La sorgente luminosa è costituita da un sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro (Indice di resa cromatica ≥ 90), il fotoperiodo è di 16 ore di luce e 8 di buio. Un'intensità luminosa che al piano di lavoro sia compresa tra 500 e 1000 lux si è generalmente dimostrata adeguata.

3.5 - Temperatura

Il campione da saggiare o le sue diluizioni sono mantenute per tutta la durata della sperimentazione a 20 ± 1 °C. Se invece, i risultati ottenuti dal saggio acuto dovranno essere esaminati in relazione a dati di tossicità cronica prodotti con lo stesso organismo, la tossicità acuta del campione deve essere misurata a 25 ± 1 °C, e cioè alla temperatura prevista per la conduzione del saggio cronico. Per entrambi i valori di temperatura il risultato è conseguibile immergendo i contenitori del saggio in un bagno termostatato o condizionando la temperatura dell'intero ambiente in cui è condotto il lavoro sperimentale.

3.6 - Alimentazione

In generale i giovani individui di *C. dubia* non vengono nutriti durante la prova. Tuttavia, se essi non sono utilizzati entro 2-3 ore dall'isolamento dai recipienti in cui sono schiusi, può essere suggerita la somministrazione di cibo, fino al loro trasferimento nelle soluzioni test, nei quantitativi indicati per l'allevamento del cladocero (cfr. Appendice A4). Similmente, se si intende prolungare il saggio fino alle 96 h di esposizione (20 ± 1 °C), circa 2 h prima del rinnovo delle soluzioni e quindi del trasferimento degli organismi (cfr. par. 4), si somministra la stessa dieta usata per le colture. Il rinnovo è solitamente effettuato allo scadere delle 48 h di saggio.

3.7 - Ossigeno disciolto

Raggiunta la temperatura prevista per il saggio, è necessario misurare la concentrazione di ossigeno disciolto nel campione destinato alla prova. Se tale concentrazione risulta prossima o inferiore al 40 % del valore di saturazione, è necessario aerare l'aliquota del campione da saggiare. L'aerazione deve essere moderata in modo da minimizzare i cambiamenti del campione, quali ad esempio quelli relativi al valore di pH, al contenuto di sostanze facilmente ossidabili o volatili. L'importanza e la necessità di intervenire prima dell'allestimento della prova, è dovuta al fatto che successivamente sarebbe pressoché impossibile aerare i piccoli volumi delle soluzioni di saggio senza arrecare disturbo agli organismi. Se, tuttavia, durante il saggio si osserva che il consumo di ossigeno è tale da rischiare di invalidare la prova, si può intervenire con rinnovi più frequenti delle soluzioni, ricorrendo a nuove aliquote di campione preventivamente aerato. Considerazioni analoghe valgono anche per i trattamenti di controllo.

4 - PROCEDURA DI SAGGIO CON DILUIZIONE (EFFLUENTE)

4.1 - Saggio preliminare

Generalmente, la misura degli effetti tossici acuti di un effluente o di un corso d'acqua, è effettuata senza acquisire dei dati preliminari sulla loro tossicità. In taluni casi, quando ad esempio si sospetta che un campione sia molto tossico, può essere, tuttavia, vantaggioso disporre di informazioni preliminari per meglio impostare i saggi tossicologici definitivi.

In queste eventualità si allestisce una prova preliminare semplificata e di durata inferiore a quella definitiva. Si preparano 5 diluizioni del campione, con volume di 20 mL ciascuna, scelte in modo da coprire un ampio intervallo di concentrazioni. La sequenza 100 %, 10 %, 1 %, 0,1 % e 0,01 % (v/v) può essere adottata a questo scopo. In ogni contenitore sono introdotti 5 neonati di *C. dubia* e dopo un massimo di 24 h si registrano i risultati. Se il campione della prova preliminare dovrà essere saggiato anche nella prova definitiva, si raccomanda di procedere nel rispetto dei limiti di conservabilità del campione stesso. Se viceversa le due prove sono condotte con campioni prelevati in momenti diversi, si tenga presente che, a causa della variabilità più o meno accentuata della tossicità dello scarico o del recettore, i risultati del saggio preliminare e di quello definitivo possono essere anche molto diversi.

4.2 - Saggio definitivo

Per la conduzione del saggio definitivo, è necessario preparare almeno 5 diluizioni del campione in esame. Una serie che si è dimostrata applicabile a gran parte delle situazioni è la seguente: 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 % e 6,25

% (v/v). I valori sono in serie geometrica con un fattore di diluizione pari a 0,5. In casi particolari, come quelli individuati da un eventuale saggio preliminare, si possono adottare altre sequenze, con un diverso fattore di diluizione o anche un maggiore numero di diluizioni.

Se è stato necessario refrigerare i campioni, le aliquote destinate al saggio sono prelevate dopo accurato mescolamento e portate alla temperatura scelta per la prova. Si procede quindi alla misurazione della concentrazione di O_2 disciolto, in accordo alle indicazioni date in precedenza (cfr. par. 3.7). Solo quando le 5 o più diluizioni hanno raggiunto le condizioni indicate per il test, vengono immessi gli organismi. Analoga procedura vale anche per il gruppo di organismi di controllo.

Nei saggi di tossicità acuta l'allestimento di più repliche per ogni concentrazione risponde prevalentemente a necessità di tipo pratico; infatti, i singoli risultati che esse forniscono sono, solitamente, combinati in un unico dato riferito al corrispondente valore di concentrazione. Questa consuetudine rende pressoché inutile l'allestimento di più repliche, a meno che vengano utilizzati più organismi di quanti ne sono previsti nello schema di base qui proposto. In accordo con quest'ultimo per ogni diluizione di effluente o di acqua del recettore si utilizzano almeno 10 neonati di *C. dubia* di età ≤24 h, in soluzioni di volume pari a 20 mL.

Per il trasferimento si utilizza una pipetta di vetro, provvista di bulbo in lattice per l'aspirazione e con diametro interno di almeno un paio di mm, avendo cura di premere il bulbo per immettere gli organismi nel nuovo recipiente, solo quando l'estremità della pipetta è sotto la superficie del liquido. Per evitare una diluizione significativa delle soluzioni di saggio, si raccomanda di limitare al minimo il volume di acqua trasferito con gli animali.

L'eventuale prosecuzione della prova fino a 96 h, richiede che le soluzioni del saggio siano rinnovate almeno una volta e allo scadere delle 48 h. In base ai criteri già enunciati, si può anche decidere di aumentare la frequenza di rinnovo delle soluzioni e in ogni caso le soluzioni fresche sono preparate rispettando la stessa procedura descritta per l'allestimento del saggio. Allo scadere delle 48 h, o comunque al momento del rinnovo, i giovani individui di ceriodafnia sono trasferiti nelle diluizioni corrispondenti a quelle cui sono già stati esposti. Giornalmente e a intervalli di esposizione costanti (24 h, 48 h etc.), si ispezionano i contenitori di saggio, con l'aiuto di un microscopio binoculare, al fine di registrare e rimuovere gli eventuali organismi deceduti.

Gli esemplari sopravvissuti alla prova tossicologica, inclusi gli organismi di controllo, non potranno essere riutilizzati.

5 - PROCEDURA DI SAGGIO SENZA DILUIZIONE (CORPO IDRICO)

5.1 - Saggio definitivo

Per determinare se un corpo idrico contiene tossici capaci di determinare effetti acuti (a breve termine) su *C. dubia*, si espongono i neonati di questo crostaceo ad un campione non diluito delle acque dello stesso. Se le caratteristiche di quest'ultimo, almeno in termini di durezza, sono sostanzialmente diverse da quelle dell'acqua di allevamento, è necessario utilizzare neonati prodotti da femmine acclimatate ad un mezzo avente durezza simile a quella del campione da saggiare (cfr. paragrafo 3.3 e Appendice A3). In tal caso, la prova di controllo è allestita usando l'acqua di acclimatazione.

Il campione del corpo idrico viene saggiato in quattro repliche e in modo analogo viene allestita la prova di controllo. In ciascuna delle repliche, aventi volume di 20 mL sono introdotti 10 neonati di *C. dubia*. Contrariamente alla procedura dei saggi con diluizione, in questo caso i risultati delle diverse repliche non vengono cumulati bensì utilizzati per valutare se le eventuali differenze di sopravvivenza (o mortalità), tra gli organismi esposti al campione e quelli esposti al mezzo di controllo, sono statisticamente significative. Per quanto riguarda le restanti condizioni di saggio esse sono da considerare invariate rispetto a quanto già descritto.

Se la tossicità del corpo idrico risultasse tale da causare una mortalità superiore al 50 % degli organismi si può procedere alla misura della tossicità acuta in termini di LC_{50}. In questo caso la procedura da seguire è quella descritta per il saggio con diluizione (cfr. par. 4).

6 - VALIDITÀ DEL SAGGIO

I risultati dei saggi sono giudicati accettabili se al termine del periodo di esposizione la sopravvivenza degli organismi di controllo è ≥ 90 % e se la concentrazione di ossigeno disciolto si è mantenuta ≥ 40 % del valore di saturazione.

Pur senza imporre altri vincoli alla validità del saggio, è consigliabile la conduzione periodica di test in condizioni standard con un tossico di riferimento, quale ad esempio il bicromato di potassio o il pentaclorofenolo. Questa pratica fa si che sia disponibile un'ampia serie di valori di LC_{50} del test prescelto rispetto alla quale dovrebbe essere possibile evidenziare delle condizioni sperimentali o lotti di organismi, per qualche motivo, anomali. In condizioni normali, il risultato di ogni nuovo saggio di riferimento dovrebbe collocarsi entro l'intervallo definito dal valore medio delle precedenti LC_{50} e dal doppio della

loro deviazione standard (media ± 2 D.S.). Viceversa, se la LC_{50} del tossico di riferimento si colloca all'esterno di questo intervallo di sicurezza, tutti i dati ottenuti con il medesimo lotto di organismi e in quel periodo sperimentale dovrebbero essere considerati con cautela.

A scopo informativo, vengono riportati alcuni dati di letteratura relativi al saggio acuto con *C. dubia*. Una serie di 7 prove condotte da un unico laboratorio sullo scarico di un impianto di depurazione civile diede un valore medio della $48hLC_{50}$ di 26,16 (v/v) con un coefficiente di variazione del 28,5% (in RUE *et al.*, 1988). Una analoga serie di 15 saggi diede un valore medio di $48hLC_{50}$ pari a 60,0 (v/v) con un CV del 31,1%. Il confronto tra il saggio acuto con *C. dubia* e quello con il ciprinide *Pimephales promelas*, condotti in parallelo sui medesimi campioni di acqua di scarico, fornì una $48LC_{50}$ media di 78,4% per il crostaceo e di 75,8% per il pesce con CV rispettivamente di 33,1 e 19,6% (NORBERG-KING, 1989, memorandum).

Il saggio acuto con *C. dubia* è stato oggetto di due studi di intercalibrazione entrambi con lo stesso tossico di riferimento: il KCl (25 °C, durezza 80-100 mg/L $CaCO_3$) (US EPA, 1991). Al primo parteciparono 11 laboratori e risultò una $48hLC_{50}$ media di 264 mg KCl/L con un CV del 48,5%. Al secondo studio parteciparono 171 laboratori consentendo la valutazione di una $48hLC_{50}$ media di 432 mg KCl/L e di un CV pari a 39,8%.

7 - ANALISI DEI RISULTATI

7.1 - CALCOLO DELLA LC_{50}

Il saggio per la valutazione della tossicità acuta descritto in questa procedura si propone non solo l'identificazione delle sorgenti di contaminazione capaci di effetti tossici acuti ma anche la quantificazione della loro potenziale tossicità mediante la stima della concentrazione letale al 50% degli organismi (LC_{50}) per un dato tempo di esposizione (24-48 h). La determinazione della LC_{50} può essere effettuata con diversi metodi la cui applicabilità è in buona parte dipendente dal tipo di risultati ottenuti, e più precisamente dal numero di effetti parziali osservati, intermedi cioè tra la mortalità 100% e la mortalità nulla. La valutazione della LC_{50} dovrebbe basarsi sui risultati relativi ad almeno 5 concentrazioni di campione ed un controllo, sebbene molti metodi di analisi possano essere utilizzati con un numero di dati inferiore. Se la massima concentrazione saggiata ha causato una mortalità inferiore al 50%, non si dovrebbe procedere al calcolo della LC_{50}, il cui valore sarebbe in tal caso poco attendibile. Meglio ripetere il saggio, se possibile, cercando di migliorare la serie delle concentrazioni saggiate. In caso contrario la LC_{50} sarà più correttamente espressa come "maggiore della massima concentrazione sperimentata" (es. $48hLC_{50}$ > 80%).

Nel metodo di saggio dedicato alla valutazione della tossicità acuta con *Daphnia magna* (IRSA, 1994) sono stati proposti tre diversi metodi, ampiamente validati, atti alla valutazione della LC_{50}. Si tratta del metodo di Litchfield e Wilcoxon, del test binomiale e del metodo probit. Essi sono adeguatamente illustrati nell'ambito del metodo per *D. magna* al quale si rinvia. Infine, è opportuno segnalare che sono disponibili in commercio alcuni programmi per personal computer espressamente dedicati a diversi metodi di analisi statistica di risultati tossicologici: a questi prodotti parimenti si rinvia.

7.2 - EFFETTI DA CONCENTRAZIONE UNICA

L'esame dei risultati ottenuti saggiando un campione non diluito del corpo idrico è riconducibile alla teoria del confronto tra due campioni. Nel presente schema sperimentale, i decessi osservati nelle repliche del corpo idrico e in quelle del controllo rappresentano i due campioni di dati posti a confronto.

Di fatto, se la mortalità degli organismi esposti al corpo idrico supera il valore del 10%, e cioè quel limite di decessi accettato come "naturale" in un gruppo di individui di controllo, si può già concludere che il campione contiene inquinanti a concentrazioni tossiche. Tuttavia può essere opportuno dare supporto statistico al risultato del saggio, verificando la cosiddetta ipotesi nulla o zero, e cioè che le medie dei decessi osservati nei due trattamenti siano uguali. Smentire l'ipotesi con un certo grado di probabilità, solitamente P = 0,05, equivale a verificare che la mortalità osservata per gli organismi esposti al corpo idrico è significativa.

Il test "t" è utilizzato per confrontare i due campioni e, dal momento che vi è un'attesa di contaminazione o di mortalità maggiore per il campione del corpo idrico piuttosto che per il controllo, un test unilaterale è generalmente adeguato. L'applicazione del test "t" richiede che le proporzioni di decessi osservati nelle repliche siano distribuite normalmente. Se i dati soddisfano questo requisito è necessario procedere anche alla verifica di omogeneità della varianza dei due gruppi di risultati e solo in caso affermativo è lecito passare all'esame della significatività dei decessi osservati. Se i dati non fossero distribuiti normalmente il problema viene comunemente risolto mediante opportune trasformazioni dei dati stessi. La conversione delle proporzioni di organismi deceduti nella radice quadra del loro arc sen è la trasformazione più comune. Se non si rivelasse risolutiva è necessario proce-

dere all'esame dei risultati con metodi non parametrici. Se, a sua volta, la condizione di omogeneità della varianza non fosse rispettata, il test "t" rimane valido ma deve essere applicato in forma modificata. Il valore calcolato per la funzione "t" è infine confrontato con il valore critico di "t" individuabile in apposite tabelle, in base al numero di gradi di libertà ed al livello di probabilità prescelto. Se il valore di "t" calcolato supera il valore tabellare, le due mortalità sono significativamente diverse. Fortunatamente sono disponibili in commercio dei programmi per personal computer che sono espressamente dedicati all'analisi statistica di risultati tossicologici e possono svolgere tutte le operazioni necessarie. A questi prodotti, pertanto, si rinvia.

APPENDICE

A1- Note sulla sistematica e biologia di *Ceriodaphnia dubia*

I Crostacei Cladoceri sono organismi di piccole dimensioni, in larga parte planctonici, che popolano prevalentemente le acque dolci. In particolare, le specie appartenenti alla famiglia Daphnidae sono ubiquitarie delle acque dolci della fascia temperata e a questa famiglia appartengono tre specie che rivestono grande interesse per gli studi tossicologici, e cioè *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* e *Ceriodaphnia dubia*. Quest'ultima, relativamente a tali studi, è quella di più recente acquisizione (MOUNT e NORBERG, 1984).

Caratteristiche generali dei Cladoceri sono la compressione laterale del corpo, il carapace bivalve che racchiude il tronco, l'unico grande occhio composto, la presenza di antennule e di antenne, le prime immobili con papille olfattorie e setole sensoriali e le seconde con funzione natatoria, molto sviluppate. Il postaddome, che è una formazione esclusiva dei Cladoceri, ha ornamentazioni aventi valore tassonomico.

In *Ceriodaphnia*, come in generale nei Cladoceri, i sessi sono separati e con un evidente dimorfismo. In Fig. 1 è illustrato l'aspetto di una femmina partenogenetica di *C. dubia*. Essa è caratterizzata da un corpo ovale molto allargato, lungo da 0,95-1,4 mm (MARGARITORA, 1983). Il secondo paio di antenne è provvisto di 9 setole natatorie.

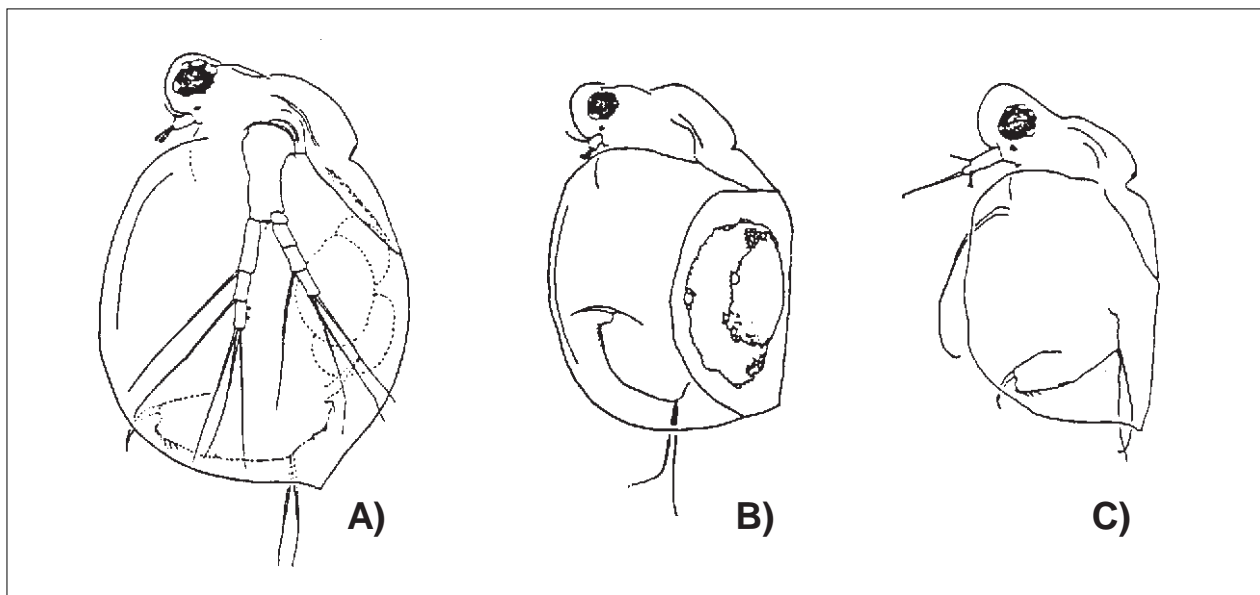



Fig. 1 - *Ceriodaphnia dubia*:
A) femmina in attività riproduttiva partenogenetica; B) femmina con efippio; C) maschio (modificata da BERNER, 1986)

Il capo è allungato e compresso, nettamente distinto, tramite un seno cervicale, dal carapace. Quest'ultimo, che è provvisto di una reticolatura poligonale molto evidente, termina dorsalmente con un angolo aguzzo e una corta spina, appena pronunciata. L'individuo di sesso maschile, illustrato in Fig. 1, ha dimensioni di poco inferiori e forma più slanciata, meno tondeggiante. Le sue antennule sono allungate con un flagello terminale molto sviluppato. Altrettanto vale per il primo paio di appendici toraciche la cui forma è finalizzata all'accoppiamento. Sia nella femmina che nel maschio, l'artiglio terminale del postaddome presenta un pettine finemente setoloso (Fig. 1 e 2).

La presenza di *C. dubia* è stata documentata nella fascia litorale dei laghi, nei piccoli bacini e nelle raccolte d'acqua temporanee praticamente di tutto il mondo. È diffusa negli stessi distretti di una specie molto simile, nota come *C. reticulata*, anche se rispetto a questa è decisamente più rara. È presente sul territorio nazionale dove è stata rinvenuta in Istria, nel tratto inferiore del Po, in Abruzzo e in Sicilia (MARGARITORA, 1983) anche se spesso è stata citata col sinonimo di *C. affinis*.

Durante gran parte dell'anno, la popolazione di *C. dubia* consiste pressoché esclusivamente di individui di

Fig. 2 - Postaddome di *Ceriodaphnia dubia*: 1) femmina partenogenetica: 2) dettaglio dell'artiglio terminale; 3) maschio (BERNER, 1986)

sesso femminile che si riproducono con uova partenogenetiche. Queste sono deposte nella camera dorsale di incubazione (Fig. 1), in numero da 4 a 10 o più, e schiuse anche di 20 neonati non sono infrequenti. I giovani individui sono pressoché identici agli adulti e pertanto si accrescono senza un vero processo di metamorfosi (sviluppo diretto). L'accrescimento, che ha maggiore velocità nel periodo giovanile, ha luogo subito dopo ogni evento di muta, quando il nuovo carapace è ancora elastico e l'organismo può aumentare la sua taglia.

Nei laghi e nelle raccolte d'acqua permanenti, gli individui di sesso maschile schiudono dalle uova partenogenetiche nel solo periodo autunnale, in risposta verosimilmente a stimoli ambientali quali il raffreddamento delle acque, la diminuita disponibilità di cibo e l'abbreviarsi della fase luminosa del fotoperiodo. Il risultato della riproduzione sessuata è la fecondazione di un unico uovo, che viene racchiuso in uno spesso involucro del carapace noto come efippio. Tale struttura si sviluppa nella regione dorsale, in corrispondenza della camera di incubazione (Fig. 1). L'efippio protegge l'uovo duraturo dalla disidratazione e dagli estremi di temperatura, al punto che può essere conservato per lunghi periodi di tempo senza comprometterne la vitalità. La deposizione degli efippi non rappresenta necessariamente l'atto finale dell'attività riproduttiva del Cladocero ma solo una sua fase. Dopo la produzione di uova anfigoniche può essere ripresa, infatti, la produzione di uova partenogenetiche. Gli individui muoiono solo se intervengono fattori letali, come il prosciugamento del bacino, la mancanza di cibo, i valori estremi di temperatura, lasciando tuttavia le uova durature negli efippi dai quali, se reidratati ed esposti alla temperatura appropriata, schiuderanno individui di sesso femminile che si riprodurranno nuovamente per via partenogenetica.

A2 - Allevamento degli organismi

L'allevamento di *Ceriodaphnia* deve essere avviato 23 settimane prima della conduzione dei saggi, al fine di disporre di femmine acclimatate alle condizioni di mantenimento del laboratorio e che siano in grado di produrre il numero di neonati sufficienti alla sperimentazione. Grazie alla prolificità delle femmine, solo pochi individui (20-30) sono necessari per l'avvio dell'allevamento. In caso di trasporto, questi possono essere trasferiti in un contenitore di polietilene da 1 litro, completamente riempito, nel rapporto di 20-30 individui. L'acclimatazione alle condizioni colturali del nuovo laboratorio deve essere graduale, al fine di evitare morie massive degli organismi. La procedura da preferire consiste nella progressiva sosti-

tuzione dell'acqua di spedizione con percentuali crescenti (25, 50, 75, 100%) del mezzo in uso nel laboratorio, completando il trasferimento in 48-72 ore. Anche per quanto riguarda la temperatura, i bruschi cambiamenti devono essere evitati, limitando le variazioni a 2-3 °C nell'arco di 24-48 ore.

È preferibile organizzare l'allevamento secondo due procedure aventi diversa finalità. I due tipi di allevamento che ne derivano sono definibili l'uno come "massivo" e l'altro come "controllato".

L'allevamento di tipo massivo ha come scopo quello di garantire la sopravvivenza della specie in laboratorio e di fornire gli organismi necessari all'allevamento controllato. Per la procedura massiva sono utilizzati dei contenitori da 1 - 2 L, tipo beaker o cristallizzatori, ma anche dei piccoli acquari in "tutto vetro" possono prestarsi allo scopo. Almeno due colture, ma preferibilmente più di due, sono mantenute in recipienti distinti. Esse sono allestite con non più di 40-50 organismi per ogni litro di mezzo, alimentati giornalmente e trasferiti in mezzo fresco almeno una, ma meglio due volte per settimana. Ogni 14 giorni la coltura viene scartata e riallestita con un nuovo gruppo di neonati appartenenti alla terza schiusa o successive.

Gli allevamenti di tipo controllato sono mantenuti come fonte diretta di neonati per i saggi tossicologici. In questo caso le femmine di *C. dubia* possono essere allevate sia in piccoli gruppi, che singolarmente, ed in entrambi i casi, ogni individuo deve avere a disposizione un volume di almeno 15 mL di mezzo. La somministrazione del cibo è quotidiana ed il trasferimento degli organismi deve essere effettuato almeno a giorni alterni, ma preferibilmente anch'esso con frequenza giornaliera. Nel caso venga adottata la soluzione minima di tre cambi settimanali, lunedì, mercoledì e venerdì sono i giorni consigliati. Si tenga presente, tuttavia, che giornalmente si deve procedere alla rimozione e alla conta dei neonati prodotti.

Se l'allevamento è in buone condizioni, ogni femmina dovrebbe produrre tre schiuse nell'arco di 7 giorni (25 ± 1 °C), con un numero medio di neonati pari o superiore a 15; nello stesso arco di tempo, gli eventuali decessi non devono superare il limite del 20%. In caso contrario sussistono dei problemi che sono solitamente dipendenti dalla qualità del mezzo o della dieta. Dopo un massimo di 14 giorni, le femmine adulte sono scartate e gli allevamenti riallestiti con giovani individui di terza schiusa o successive.

Anche nel caso degli allevamenti di tipo controllato è consigliato mantenere più gruppi di organismi o più serie di singoli individui, sfalsate nell'allestimento di una settimana, e ciò per garantire una disponibilità praticamente continua di neonati.

A3 - Acqua di allevamento

C. dubia può essere allevata con successo in acque di vario tipo quali acque di falda e acque superficiali non contaminate ed anche in acque di rete, purché non clorate. Al fine di non esporre gli organismi in coltura a continue e talvolta eccessive variazioni delle caratteristiche del mezzo, sono da preferire quelle fonti che dimostrano, nel tempo, la maggiore stabilità dei parametri chimico-fisici. In considerazione dei molteplici aspetti che debbono essere soddisfatti dal mezzo di allevamento (tossicologico, nutrizionale, di riproducibilità dei risultati, di facilità di approvvigionamento etc.) l'impiego di un'acqua minerale, o più esattamente l'impiego di un'acqua sintetica preparata a partire da un'acqua minerale di tipo commerciale, si può configurare come una soluzione ottimale. Un acqua di questo tipo è infatti facilmente disponibile, altrettanto facilmente preparabile, è di qualità nota e poco variabile, permette buoni risultati in termini di accrescimento e attività riproduttiva e assicura la riproducibilità di tali risultati. Sono possibili due modi di impiego di un'acqua minerale scelta tra quelle disponibili in commercio.

Nel primo caso, ci si serve di un'acqua con un elevato contenuto di sali e ad una certa aliquota di acqua minerale viene aggiunta acqua Milli-Q® o di qualità equivalente, in modo da ottenere, per diluizione, il mezzo semisintetico con le caratteristiche volute.

Nel secondo caso, ci si serve di un'acqua a basso contenuto di sali (oligominerale), che viene corretta nei suoi costituenti maggiori mediante l'aggiunta di sali di grado analitico a dare il mezzo con i valori di alcalinità e durezza desiderati.

Entrambe le soluzioni sono state ampiamente collaudate con successo (US EPA, 1989; VIGANÒ, 1991, 1992; COONEY *et al.*, 1992a). Al più si può osservare che nel secondo tipo di impiego il pool di micronutrienti, fornito dall'acqua minerale prescelta, resta invariato nei diversi mezzi di coltura ottenibili. Inoltre, il secondo tipo di applicazione evita, a differenza del primo, il rischio tossicologico introdotto dall'uso di acqua deionizzata per la diluizione dell'acqua minerale, rischio che periodicamente si potrebbe concretizzare in effetti negativi sulla coltura del cladocero (COONEY *et al.*, 1992b), a meno di controlli assidui sulla efficienza del deionizzatore. Nel primo tipo di applicazione, infine, può formarsi un precipitato nei mezzi di coltura con durezza ≥ 180 mg $CaCO_3$/L (US EPA,1989; PATTERSON *et al.*, 1992).

Fatta eccezione per quelle colture di organismi che sono dedicate a saggiare dei campioni con caratteristiche peculiari, in generale si consiglia di adottare un mezzo

semisintetico con le seguenti caratteristiche: durezza 140-160 mg $CaCO_3$/L, alcalinità 110-120 mg $CaCO_3$/L, Ca/Mg > 1 e prossimo a 4, N/K > 1 e prossimo a 10. L'acqua semisintetica viene preparata in volumi dell'ordine di alcune decine di litri e conservata in recipienti di vetro o polietilene dedicati esclusivamente a questo scopo. I recipienti devono essere mantenuti al riparo da fonti di contaminazione e preferibilmente anche dalla luce per evitare crescite algali o batteriche indesiderate.

Se viene utilizzata un'acqua naturale, è necessario filtrarla attraverso membrane da 0,22 µm, minimizzando in questo modo l'eventualità di un apporto incontrollato di cibo o comunque di particelle aventi valore nutrizionale, come pure l'introduzione di agenti patogeni o di altri organismi indesiderati. Se necessario, si può correggere il contenuto di alcuni dei costituenti maggiori aggiungendo sali di grado analitico ($MgSO_4$, $CaCl_2$, $NaHCO_3$, KCl) o diluendo con acqua Milli-Q®. Il passaggio su una colonna di carbone attivo può avere un netto effetto migliorativo sulla qualità del mezzo, e tuttavia si raccomanda il controllo analitico periodico di alcuni parametri (Tab. 1).

Qualora si voglia adottare un nuovo mezzo di coltura è opportuno verificarne preliminarmente l'idoneità su un numero limitato di organismi. La procedura consigliata è quella del confronto con un mezzo di idoneità comprovata e a tale scopo si allestisce un saggio, della durata minima di 7 giorni, nel quale due gruppi di 10 organismi ciascuno, sono esposti rispettivamente ai due mezzi da confrontare. La procedura è la stessa prevista per il saggio cronico con a *C. dubia*, ed i parametri di interesse sono sopravvivenza attività riproduttiva, a cui possono essere aggiunti la lunghezza o il peso secco degli organismi.

A4- Alimentazione

Sono varie le diete che sono state e sono utilizzate con successo per nutrire *C. dubia*. Generalmente esse risultano da combinazioni di più ingredienti, ciascuno dei quali insufficiente al mantenimento del crostaceo, se somministrato singolarmente (Cooney *et al.*, 1992b; Knight e Waller 1992; Viganò, 1992). Di solito si tratta di colture di una o più specie algali, di mangime per pesci, di lievito o suoi estratti, di foglie di cereali, vitamine e cosi via. Sembra accertato che il componente di base della dieta debba essere un'alga unicellulare. La Cloroficea *Selenastrum capricornutum* (preparata come in A5.1) si è dimostrata idonea allo scopo e va somministrata quotidianamente, in modo da garantire una densità pari, orientativamente, a 200-250.000 cell/mL (US EPA, 1989; Cooney *et al.*, 1992b). I metodi EPA (1989) e ASTM (1989) prevedono che la dieta algale venga integrata con un secondo alimento rappresentato da una miscela di tre ingredienti: mangime per pesci, foglie di cereali (Cerophy®) e lievito (cfr. Appendice A5.2). Questo alimento, preparato in sospensioni contenenti 1,8 g di solidi sospesi, è somministrato giornalmente in volumi pari a 100 µL per 15 mL di mezzo acquoso, o anche in ragione di 12 mg di solidi per ogni litro di coltura di *C. dubia*. Sia nel caso in cui la sospensione venga preparata di fresco o sia ottenuta da una aliquota scongelata, se ne consiglia il rinnovo con frequenza settimanale.

Nei laboratori IRSA-CNR è in uso una dieta semplificata secondo la quale l'alga *S. capricornutum* è somministrata ad una densità di poco superiore a quella della dieta originale, unitamente a una sospensione di lievito e a una soluzione di vitamine (cfr. A5.3)

A5 - Preparazione della dieta

A5.1 - Sospensione algale

L'alga *S. capricornutum* viene coltivata in un mezzo di coltura preparato a partire da quattro soluzioni composte dai sali di seguito elencati:

Soluzione 1:	$NaNO_3$	25,500 g/L
	$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	12,164 g/L
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,410 g/L
	H_3BO_3	185,520 mg/L
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415,380 mg/L
	$ZnCl_2$	3,270 mg/L
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,428 mg/L
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 mg/L
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,260 mg/L
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	160,000 mg/L
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	300,000 mg/L
Soluzione 2:	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	14,700 g/L
Soluzione 3:	K_2HPO_4	1,044 g/L
Soluzione 4:	$NaHCO_3$	15,000 g/L

I sali, di grado analitico, vengono solubilizzati in acqua bidistillata o Milli-Q® filtrata su membrane da 0,22 µm. Il mezzo di coltura è ottenuto per diluizione delle quattro soluzioni in ragione di 2 mL di ciascuna di esse per ogni litro di mezzo. La diluizione è anch'essa effettuata con acqua bidistillata o Milli-Q® filtrata attraverso membrane con porosità di 0,22 µm. Il mezzo viene inoculato con un volume di sospensione algale tale da ottenere una densità di circa 200.000 cell/mL. Il mezzo inoculato è posto in incubazione alla temperatura di 20 ± 2 °C, con un fotoperiodo di 16 h di luce / 8 h di buio e una intensità

luminosa di circa 4000 lux fornita da lampade fluorescenti del tipo cool-white. Nel corso dell'incubazione, il mezzo è aerato insufflando aria filtrata attraverso cannule in vetro con un flusso sufficiente a mantenere le cellule algali continuamente disperse. La scarsa agitazione può rendere inutilizzabile la coltura. Dopo 5-6 giorni di incubazione la biomassa algale raggiunge una densità prossima ai 9-10 milioni di cell/mL e si procede alla sua separazione dai residui del mezzo di coltura. Tale operazione si effettua per centrifugazione della sospensione a circa 400 RCF per 5-10 minuti. Il sovranatante è scartato mentre le alghe vengono ridisperse in acqua, utilizzando preferibilmente quella di allevamento del cladocero ma con durezza ridotta a 30-50 mg $CaCO_3$/L. Si procede, quindi, ad una seconda centrifugazione ed alla raccolta delle cellule algali in un unico contenitore, nel quale verranno conservate. In mancanza di una centrifuga o di un rotore di dimensioni adeguate, si pongono i contenitori usati per la coltura dell'alga in un frigorifero e si lasciano in quiete per diversi giorni in modo che le cellule possano sedimentare; i residui del mezzo di coltura sono poi rimossi per sifonamento (ASTM, 1989; US EPA, 1989). Il volume finale della sospensione, per i cui aggiustamenti si ricorre alla stessa acqua dei lavaggi, deve essere tale da approssimare una densità di circa 100 milioni cell/mL. La sospensione algale così ottenuta è conservabile, per alcuni mesi, al buio ed alla temperatura di 4 °C, e potrà essere la fonte dell'inoculo della successiva coltura.

Le operazioni descritte per la coltura di *S. capricornutum* devono essere condotte rispettando alcune precauzioni elementari volte a prevenire la contaminazione della coltura da parte di altre specie, algali e non. Si deve operare, pertanto, in condizioni di massima pulizia, meglio se in condizioni asettiche (sterilizzazione dei recipienti con autoclave, cappe a flusso laminare etc.) anche se una limitata contaminazione batterica non sembra influire negativamente sul risultato finale (ASTM, 1989).

A5.2 - ALIMENTO COMPOSITO

L'alimento composito, che in letteratura è spesso indicato con la sigla "YTC" (ASTM, 1989; US EPA, 1989), viene preparato secondo le seguenti indicazioni.

La preparazione a base di cibo di pesce richiede una settimana. Ad 1 L di acqua Milli-Q® vengono aggiunti e miscelati 5 g di mangime pellettizzato per trota o mangime in scaglie (Tetramin®). La sospensione viene mantenuta in aerazione per una settimana, a temperatura ambiente, compensando l'evaporazione con acqua Milli-Q® e tenendo il contenitore preferibilmente sotto una cappa aspirante, a causa dell'odore sgradevole che si sviluppa durante il processo di digestione. Al termine il contenitore viene posto in un frigorifero e lasciato in quiete in modo che la sospensione digerita possa sedimentare per un minimo di 1 ora. Si procede quindi alla filtrazione attraverso un retino con maglie di apertura di 100-150 µm e si scarta il particellato.

Per la preparazione delle foglie di cereali, 5 g del prodotto in polvere (Cerophyl®) vengono dispersi in 1 L di acqua Milli-Q®. Mediante un agitatore magnetico, la sospensione viene mantenuta in agitazione a velocità moderata per un massimo di 24 ore e lasciata poi sedimentare per almeno 1 ora, ed eventualmente filtrata attraverso un retino con maglie da 100-150 µm, scartando il materiale particolato.

Per la preparazione a base di lievito, si disperdono energicamente 5 g di lievito disidratato (*Saccharomyces cerevisiae*) in acqua Milli-Q®, sino alla completa sospensione del prodotto.

L'alimento composito è ottenuto per miscelazione di uguali volumi (circa 300 mL) dei tre preparati e, cioè, della sospensione di lievito, della fase decantata od ottenuta per filtrazione dal mangime di pesce e di quella ottenuta dalle foglie di cereali.

Prima che l'alimento composito possa essere utilizzato per la coltura di *C. dubia*, è necessario che ne venga determinato il contenuto di solidi sospesi. Tale contenuto, calcolato come media del valore di due repliche di 5 mL ciascuna, essiccate a 105 °C per 24 ore, deve essere aggiustato, se necessario, ad un valore di 1,8 g/L. L'alimento può essere suddiviso in aliquote di 50-100 mL che verranno congelate e in tal modo conservate fino al momento dell'uso. Il cibo scongelato e conservato in frigorifero, potrà essere usato per un massimo di 2 settimane, ma rinnovato preferibilmente dopo una sola settimana.

In alcuni laboratori, il processo di preparazione periodica e congelamento, è limitato al solo mangime di pesce che viene, pertanto, miscelato con aliquote preparate al momento dell'uso tanto di lievito che di Cerophyl®. Il periodo massimo d'impiego resta invariato.

A5.3 - DIETA SEMPLIFICATA

Presso i laboratori IRSA-CNR è in uso una dieta semplificata rispetto a quella proposta nei metodi USEPA (1989) o ASTM (1989) e descritta nei paragrafi precedenti. Nella dieta semplificata, l'alga *S. capricornutum* è somministrata giornalmente in modo da garantire densità di 300.000 cell/mL mentre l'alimento composito è stato sostituito con una sospensione di cellule di lievito (*S. cerevisiae*) ed una soluzione di tre vitamine.

La prima è preparata con i panetti di lievito commercializzati per la panificazione. Nell'acqua usata per l'allevamento di *C. dubia*, con durezza ridotta a 30-50 mg

$CaCO_3$/L, viene dispersa una quantità di lievito tale da approssimare la densità di 100 milioni cell/mL. Come nel caso dell'alga, anche la sospensione di lievito è conservabile al buio, a 4 °C ed è somministrata giornalmente in volumi tali da garantire un densità di 300.000 cell/mL.

Le vitamine sono preparate in una unica soluzione contenente tiamina cloridrato (vit. B_1) 75 µg/L, biotina (vit. H) 0,75 µg/L e cianocobalamina (vit. B_{12}) 1 µg/L. Per agevolare l'impiego di quantitativi così modesti si consiglia di ricorrere a una o più soluzioni intermedie concentrate. La soluzione di vitamine, che è conservabile congelata per tempi pressoché indefiniti viene aggiunta, al momento dell'uso, all'acqua di allevamento del crostaceo e nella quantità di 1 mL/L

A6 - Riproduzione

L'attività riproduttiva di *C. dubia* è largamente dipendente dalla temperatura, dalla qualità dell'acqua e dalla qualità e quantità del cibo (ASTM, 1989). La temperatura dell'acqua delle colture deve essere mantenuta al valore cui saranno condotte le prove di tossicità, e pertanto a 20 ± 1 °C o 25 ± 1 °C. *C. dubia* ha ricevuto grande attenzione soprattutto perché permette di condurre una saggio cronico in 7 giorni a 25 °C, mentre il saggio acuto con questo organismo è di interesse minore, se non quando è posto in relazione con i dati di tipo cronico. Per questo motivo la grande maggioranza dei saggi acuti è condotta alla temperatura di 25 °C, invece che a 20 °C, e per lo stesso motivo gran parte dei dati sulla riproduzione e sull'allevamento di *C. dubia* proviene da colture mantenute a 25 °C. Se, tuttavia, si decide di allevare l'organismo a 20 ± 1 °C, si tenga presente che la sua longevità aumenta (da circa 30 a 50 giorni), che diminuisce la frequenza delle schiuse prodotte, e che il numero medio di neonati per schiusa è maggiore che non alla temperatura superiore (COWGILL *et al.*, 1985).

Il fotoperiodo consigliato è di 16 ore di luce e 8 di buio. All'opposto una consistente riduzione delle ore di luce potrebbe stimolare una indesiderata produzione di individui di sesso maschile al punto che il mantenimento della stessa coltura diverrebbe problematico (COONEY *et al.*, 1992a). Per quanto riguarda l'intensità luminosa, i livelli comunemente riscontrabili in laboratorio possono essere accettabili e, in ogni caso, si consigliano valori che siano compresi nell'ambito di 500-1000 lux. Si tenga presente che le elevate intensità luminose possono indurre un'attività fotosintetica del *Selenastrum* somministrato come alimento, tale da aumentare il pH del mezzo sino a valori che potrebbero rivelarsi dannosi o anche letali per il crostaceo (pH 9). Compatibilmente con il potere tampone dell'acqua di coltura e con la densità di alghe presenti, può essere preferibile mantenere valori di intensità luminosa prossimi al limite inferiore dell'intervallo consigliato (ASTM, 1989).

Alla temperatura di 25 ± 1 °C, *C. dubia* produce 3 schiuse in 7 giorni, con una sequenza secondo la quale la prima schiusa è prodotta al quarto giorno di vita ed è costituita da 3-6 neonati; la seconda è prodotta al quinto o anche al sesto giorno e si compone, mediamente, di 5-10 neonati; la terza schiusa, infine, ha luogo al settimo giorno e può comprendere da 7 a 14 individui. I valori minimi e massimi sopra riportati, che peraltro hanno valore indicativo, si riferiscono rispettivamente ad un'attività riproduttiva accettabile ed ad una ottimale. Valori inferiori a un totale di 15 neonati nelle prime tre schiuse, indicano la presenza di problemi nella coltura.

A7 - Organismi per il saggio

Per l'allestimento del saggio devono essere utilizzati i neonati di *C. dubia* aventi età ≤ 24 h e appartenenti alla terza schiusa o successive. Se l'acqua del corpo idrico da saggiare o l'acqua usata per le diluizioni di effluente, hanno caratteristiche sostanzialmente diverse dall'acqua usata per la coltura degli organismi, è necessario che i neonati da utilizzare nel saggio, siano prodotti da femmine allevate per almeno 7 giorni nella stessa acqua usata per le diluizioni del saggio di tossicità, o in un'acqua con caratteristiche similari.

Gli organismi da saggiare devono provenire da un gruppo di femmine mantenute in condizioni di allevamento controllato. Non si devono utilizzare i neonati prodotti da femmine che non rispondono ai criteri di qualità indicati per la sopravvivenza e l'attività riproduttiva, o che comunque manifestino sintomi di condizioni colturali scadenti. Come ulteriore criterio guida si può suggerire l'utilizzabilità di neonati appartenenti a schiuse composte da almeno 7-8 individui. I neonati prodotti nelle 24 h immediatamente precedenti all'allestimento del saggio, hanno l'età richiesta per la conduzione della prova tossicologica. È preferibile che essi siano nutriti se non utilizzati entro 2-3 ore dalla raccolta.

BIBLIOGRAFIA

ASTM (1989). Standard guide for conducting threebrood, renewal toxicity tests with *Ceriodaphnia dubia*. *American Society for Testing and Materials*, ASTM E 1295-89.

BERNER D.B. (1986). The taxonomy of *Ceriodaphnia* (Crustacea: Cladocera). In "U.S. Environmental Agency cultures. Environmental Monitoring and Support Laboratory", *U.S. Environmental Protection Agency*, Cincinnati, OH, 45268, EPA/600/4-86/032.

COONEY J.D., G.M. DEGRAEVE, E.L. MOORE, B.J. LENOBLE, T.L. POLLOCK E G.J. SMITH (1992a). Effects of environmental and experimental design factors on culturing and toxicity testing of *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem*., **11**: 839-850.

COONEY J.D., G.M. DEGRAEVE, E.L. MOORE, W.D. PALMER e T.L. POLLOCK (1992b). Effects of food and water quality on culturing of *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem*., **11**: 823-837.

COWGILL U.M., K.L. KEATING e L.T. TAKAHASHI (1985). Fecundity and longevity of *Ceriodaphnia dubia*/*affinis* in relation to diet at two different temperatures. *J. Crust. Biol*., **5**: 420-429.

IRSA (1994). 8020 - Metodi di valutazione della tossicità con *Daphnia*. In "Metodi analitici per le acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, 100: 336-342.

KNIGHT J.T. e W.T. WALLER (1992). Influence of the addition of Cerophyl on the *Selenastrum capricornutum* diet of the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem*., **11**: 521-534.

MARGARITORA F. (1983). Cladoceri (Crustacea: Cladocera). In "Guide per il riconoscimento delle specie animali nelle acque interne italiane". *CNR, P. F. "Promozione della Qualità dell'Ambiente"* n. 22, CNR AQ/1/197, pp 169.

MOUNT D.L. e T.J. NORBERG (1984). A seven-day lifecycle cladoceran toxicity test. *Environ. Toxicol. Chem*. **3**: 425-434.

PATTERSON P.W., K.L. DICKSON, W.T. WALLER e J.H. RODGERS (1992). The effects of nine diet and water combinations on the culture health of *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem*., **11**: 1023-1035.

RUE J.W., J.A. FAVA e D.R. GROTHE (1988). A review of inter- and intralaboratory effluent toxicity test method variabi!ity. In "Aquatic Toxicology and Hazard Assessment", 10th vol., ASTM STP 971, W.J. Adams, G.A. Chapman and W.G. Landis, Eds., *American Society for Testing and Materials*, Philadelphia: 190-203.

US EPA (1989). Cladoceran, *Ceriodaphnia dubia* survival and reproduction tests", Method 1002. In "Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms", C.I. Weber, W.H. Peltier, T.J. Norberg-King; W.B. Horning, F.A. Kessier, J. Menkedick *et al*.. EMSL, *US Environmental Protection Agency*, Cincinnati, OH, EPA-600/4-89-001.

US EPA (1991). Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. C.I. Weber, *U.S. Environmental Protection Agency*, Report EPA/600/4-90/027, Cincinnati, OH.

VIGANÒ L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*., **47**: 775-782.

VIGANÒ L. (1992). Prime applicazioni del saggio a 7 giorni con *Ceriodaphnia dubia* allo studio della tossicità di acque superficiali. In "Atti del 5° Congresso Nazionale S.It.E.", Marchetti R. e Cotta Ramusino M. eds., Milano 21-25 sett; 1992: 677-682.

METODO PER LA VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ ACUTA CON *Mysidopsis bahia*(*)

a cura di L. Viganò, IRSA-CNR, Brugherio (Milano)

RIASSUNTO

In queste note sono descritti dei metodi standardizzati per condurre dei saggi di tossicità acuta con il crostaceo marino *Mysidopsis bahia*. Questi metodi sono utilizzati per evidenziare in acque di mare e in effluenti di scarico la presenza di sostanze a concentrazioni capaci di effetti tossici e per misurare la loro tossicità acuta solitamente espressa come concentrazione letale per il 50% degli organismi (LC_{50}). In appendice sono ampiamente descritte le condizioni di allevamento in laboratorio del crostaceo e come ottenere i giovani individui necessari alla conduzione dei saggi.

SUMMARY

This paper describes standardized methods to conduct acute toxicity tests with *Mysidopsis bahia*, a marine crustacean. These methods are used to assess the presence of toxic chemicals in toxic amounts in effluents and marine waters and to measure their acute toxicity usually reported as lethal concentration to 50% of the organisms (LC_{50}). Also included is an appendix which describes in details the culture conditions of the crustacean and how to obtain the juveniles which are necessary to perform the tests.

(*) Il metodo e stato discusso ed approvato dal sottogruppo "Metodi con Crostacei" del Gruppo Metodi Biologici composto da: Amodei M., Bacci E., Baudo R., Buffagni M., De Marco M, Ferraro M., Marchetti R., Marchini S., Pasini M., Rampa P., Sbrilli G. e Viganò L.

1 - INTRODUZIONE

Viene descritta la procedura standard per saggi di tossicità acuta su campioni di acque di scarico o di corpi idrici con il crostaceo marino *Mysidopsis bahia*. I risultati ottenibili da un saggio acuto costituiscono solitamente il primo passo nella valutazione di rischio per la vita acquatica. L'assenza di effetti acuti non preclude la possibilità di effetti cronici. Inoltre, un risultato negativo con un dato campione non esclude il riscontro di effetti tossici acuti in campioni prelevati in diversi momenti, e ciò a causa, ad esempio, della possibile variabilità di uno scarico come anche della capacità di diluizione delle acque recettrici.

2 - GENERALITÀ SUL METODO

Dei giovani esemplari del crostaceo marino *Mysidopsis bahia* sono esposti per un tempo massimo di 96 ore, ad uno scarico acquoso o all'acqua di mare dell'area indagata, con lo scopo di evidenziare la presenza di sostanze tossiche in concentrazioni tali da causare effetti di tipo acuto. La procedura di saggio per un effluente prevede che un minimo di cinque gruppi di organismi coetanei, aventi età compresa tra 1 e 5 giorni, sia mantenuto a cinque diluizioni, in acqua di mare, dell'effluente da saggiare. I decessi osservati, sono poi elaborati per calcolare il valore di diluizione che si rivela letale per il 50 % degli organismi (LC_{50}) a un determinato tempo di esposizione (24, 48 o 96 h). La validità del risultato è giudicata osservando la risposta di un ulteriore gruppo di controllo che è stato mantenuto per lo stesso tempo di esposizione e nella medesima acqua di mare, ma senza aggiunta di effluente.

La stessa procedura può essere applicata per rilevare la presenza di effetti tossici acuti nell'acqua di mare dell'area recettrice, o di altre zone. È, tuttavia, infrequente che i contaminanti raggiungano in quest'ultime delle concentrazioni tali da permettere la determinazione di una LC_{50}. Pertanto il saggio si limita ad indagare l'eventuale risposta degli organismi ad un campione non diluito,

e la validità del risultato, che ben raramente va al di là di pochi decessi, è determinata in base al confronto con organismi di controllo, esposti ad acqua di mare non contaminata.

Si fa notare che per *M. bahia* è disponibile la metodica standard per condurre un saggio cronico la cui durata (7 giorni) è di poco superiore alle 96 h previste per il saggio acuto descritto in queste pagine. Poiché con semplici accorgimenti è possibile ottenere informazioni sia sulla tossicità di tipo acuto che su quella di tipo cronico mediante un unico saggio di 7 giorni, quest'ultimo è da preferire ogni qualvolta sia possibile. Se si adotta tale soluzione, è necessario attenersi alla procedura di saggio cronico alla quale si rinvia.

3 - CONDUZIONE DEL SAGGIO

3.1 - Materiali e strumentazione

La conduzione del saggio di tossicità richiede:

- numero minimo di 10 bicchieri di vetro borosilicato (beaker) con volume utile pari ad almeno 200 mL;
- lampade fluorescenti ad ampio spettro controllate da un temporizzatore, con il quale regolare il fotoperiodo, e possibilmente anche da un dispositivo che permetta la transizione graduale tra le fasi di luce e di buio;
- bagno o camera termostatati per il mantenimento della temperatura delle soluzioni da saggiare a 20 ± 1 °C per tutta la durata della sperimentazione;
- analizzatore di ossigeno disciolto;
- misuratore di salinità;
- fonte di aria compressa a bassa pressione con diffusori a pietra porosa o cannule di vetro. I compressori che comunemente alimentano gli impianti centralizzati, immettono oli e altri contaminanti nella rete di distribuzione che vanno rimossi con cartucce di carbone attivo o dispositivo analogo;
- 2-4 imbuti separatori con volume di 2 L per la schiusa di *Artemia salina*;
- cisti di *A. salina* che rispondono ai requisiti indicati in Appendice;
- miscela di sali per la preparazione di acqua di mare artificiale. La miscela commercializzata con il marchio Forty Fathoms® ha dato buoni risultati nella conduzione dei saggi e nella coltura di *M. bahia* (cfr. Appendice).

3.2 - Organismi per il saggio

Gli organismi appartenenti alla specie *M. bahia* devono avere età compresa tra 1 e 5 giorni. In tale ambito, l'età degli organismi saggiati non può differire per più di 24 ore. I giovani crostacei rispondenti a questi requisiti sono facilmente ottenibili da femmine adulte le cui uova mostrino la macchia oculare degli embrioni in corso di sviluppo. Esse vengono isolate dalle vasche della coltura di laboratorio almeno 24 h prima dell'allestimento del saggio, come descritto in Appendice.

3.3 - Acqua di diluizione

In base alle finalità del saggio, è opportuno scegliere il tipo di acqua di diluizione più adeguato.

a) Se l'obiettivo è di stimare la tossicità acuta di un effluente producendo un dato assoluto, indipendente dalle caratteristiche delle acque recettrici, verrà utilizzata un'acqua di diluizione sintetica standard. A titolo di esempio, in Tab. 1 sono elencati i sali con i rispettivi dosaggi necessari per la preparazione di acqua di mare sintetica con salinità pari a circa 31 ‰. Salinità maggiori o minori sono ottenute con quantità della miscela salina adeguate in proporzione. Per la preparazione dell'acqua di mare si usa acqua MilliQ® o deionizzata di qualità equivalente, alla quale vengono aggiunti i nove sali elencati in Tab. 1, singolarmente, secondo la sequenza indicata e assicurandosi che ciascuno si sia sciolto prima dell'aggiunta del successivo.

Per la preparazione dell'acqua di mare sintetica sono utilizzabili anche le miscele di sali già pronte e disponibili in commercio, quali Forty Fathoms® o altre, purché soddisfino i criteri di validità del saggio. L'accrescimento, l'attività riproduttiva e le altre manifestazioni vitali fortemente dipendenti dalla qualità dell'acqua, sono difficilmente soddisfatte da una miscela semplificata come quella riportata in Tab. 1 e, pertanto, se l'acqua sintetica deve essere impiegata anche nei saggi cronici e per la coltura degli organismi, si consiglia solo l'uso di miscele complete. La salinità prevista per un saggio in condizioni standard è di 35 ‰.

Tab. 1 - Elenco dei sali di grado analitico e quantitativi necessari alla preparazione di acqua di mare artificiale di salinità 31‰.

Composto	Concentraz. (g/L)	Quantità richiesta per 20 L (g)
$NaCl$	21,03	420,6
Na_2SO_4	3,52	70,4
KCl	0,61	12,2
KBr	0,088	1,76
$Na_2B_4O_7 \cdot 10\ H_2O$	0,034	0,68
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	9,50	190,0
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	1,32	26,4
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,02	0,4
$NaHCO_3$	0,17	3,4

b) Nel caso la finalità del saggio sia quella di stimare la tossicità acuta di uno scarico nelle acque recettrici non contaminate, sarà necessario usare come acqua di diluizione quella prelevata nell'area di sversamento ma in zona non inquinata. L'acqua di diluizione dovrebbe essere prelevata immediatamente prima del saggio, o comunque, non oltre 96 h dallo stesso. Se non usata entro 24 h dal prelievo, l'acqua di diluizione verrà refrigerata (4 °C). Se l'area recettrice è contaminata o sospettata di esserlo, si può ricorrere ad acque naturali o semisintetiche aventi caratteristiche fisiche e chimiche il più possibile simili a quelle dell'acqua recettrice.

c) Se, infine, l'obiettivo del saggio è di esaminare le interazioni, tra i contaminanti dello scarico e quelli già presenti nell'acqua recettrice, quest'ultima sarà utilizzata come acqua di diluizione, indipendentemente dal suo grado di contaminazione purché prelevata al di fuori dell'area influenzata dallo scarico in esame. Nell'allestimento di questo tipo di saggio è necessario includere un secondo gruppo di controllo in cui gli organismi vengono esposti solo ad acqua di allevamento.

Generalmente un effluente ha una salinità trascurabile. Gli organismi devono tuttavia essere esposti alle diverse diluizioni di uno scarico senza che le differenti salinità delle soluzioni possano rappresentare una fonte di stress aggiuntivo a quello dei tossici o più semplicemente una fonte di variabilità dei risultati. Si tratta pertanto di uniformare la salinità delle diverse diluizioni di acqua di scarico. A questo scopo, si dispone di due soluzioni: la prima prevede l'impiego di acqua di mare ipersalina (100 ‰) come acqua di diluizione, mentre la seconda consiste nell'aggiungere i sali per la preparazione di acqua di mare artificiale.

Il principale vantaggio della prima soluzione è che l'acqua ipersalina può essere ottenuta, previa filtrazione (≤ 1 μm) e per evaporazione controllata (< 40 °C), da acqua di mare naturale di elevata qualità (aree pelagiche). Come tale essa contiene tutti i micronutrienti e colloidi biogenici richiesti per l'accrescimento e l'attività riproduttiva degli organismi marini, e può essere conservata al buio e a temperatura ambiente per periodi prolungati senza apparente degradazione. Il limite della prima soluzione risiede nel fatto che un effluente può essere saggiato ad una concentrazione massima non superiore all'80 % se la salinità prescelta è del 20 ‰ od anche del 70 % se la salinità voluta è del 30 ‰. La seconda soluzione non presenta questo limite ma l'aggiunta di sali può, dal canto suo, modificare il pH dell'effluente o dell'eventuale acqua che richiede aggiustamenti, potendo alterare in tal modo anche la tossicità del campione. In generale, si tenga presente che valori di pH al di fuori dell'intervallo 6-9 possono contribuire alla mortalità degli organismi Se necessario il pH può essere riportato al valore desiderato con aggiunte di HCl o NaOH. Dopo l'aggiunta dei sali la soluzione viene mantenuta in agitazione moderata per circa 60 min con l'aiuto di un agitatore magnetico, e ciò per garantire che tutti i sali siano entrati in soluzione prima di introdurre gli organismi. È consigliabile includere nella serie dei trattamenti anche un controllo con acqua preparata in modo analogo per aggiunta di sali, al fine di verificare che tale procedura non causi effetti negativi.

3.4 - Illuminazione

Il saggio viene condotto conservando le stesse condizioni di illuminazione alle quali sono allevati gli organismi. Il sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro, deve fornire a livello dell'area di sperimentazione un'intensità luminosa compresa tra 500 e 1000 lux con un fotoperiodo di 16 h di luce e 8 h di buio.

3.5 - Temperatura

La temperatura a cui devono essere mantenute le soluzioni sottoposte a saggio è fissata in 20 ± 1 °C. Questa condizione è raggiunta immergendo i beaker del saggio in un bagno termostatato o operando all'interno di un ambiente interamente condizionato alla temperatura voluta. Nel caso il risultato tossicologico debba essere usato per indagare il rapporto tra la tossicità acuta e cronica dell'effluente in esame, il saggio acuto deve essere condotto alla stessa temperatura di 26-27 °C prevista per il saggio cronico.

3.6 - Alimentazione

I giovani di *M. bahia* sono alimentati con naupli di *A. salina* schiusi, preferibilmente, da alcune ore e non oltre le 24 h (cfr. A4). I naupli sono somministrati sia durante il periodo di mantenimento precedente il saggio (massimo 5 giorni) che durante il saggio stesso. Nel corso della prova l'alimentazione è quotidiana e può essere quantificata sulla base di circa 100 naupli per ogni misidaceo. Se la somministrazione dell'intera quantità di cibo causasse un deficit significativo della concentrazione di O_2 disciolto, essa può essere ripartita in due tempi (50 naupli/misidaceo) adeguatamente distanziati nell'arco della giornata.

3.7 - Ossigeno disciolto

In presenza di valori elevati di BOD e alle concentrazioni più elevate di acqua di scarico, è maggiore il rischio che l'ossigeno disciolto scenda a livelli critici, non

compatibili con la sopravvivenza degli organismi. Si raccomanda pertanto di controllare questo parametro e con maggior frequenza durante le prime ore di sperimentazione. Se la concentrazione di O_2 disciolto scende al di sotto del 60 % del valore di saturazione (Tab. 1) si rende necessario aerare le soluzioni di effluente, facendo gorgogliare aria nei beaker di saggio mediante cannule in vetro o pipette pasteur. Nel caso si debba procedere all'aerazione di una diluizione del campione, tutte le restanti devono essere aerate in modo analogo, includendo anche i recipienti di controllo. Il flusso d'aria deve essere mantenuto ad un livello minimo che non arrechi disturbo agli organismi. Usando delle cannule di vetro o delle pipette pasteur, si può considerare come indicativo un flusso pari a 100 bolle/minuto.

4- PROCEDURA DI SAGGIO CON DILUIZIONE (EFFLUENTE)

4.1 - Saggio preliminare

Nel caso di campioni a tossicità completamente sconosciuta o sospettati di essere particolarmente tossici, può essere vantaggioso effettuare una prova preliminare per definire l'intervallo di tossicità entro cui condurre, successivamente, il saggio definitivo.

Un saggio preliminare consiste in un prova abbreviata e semplificata, per la quale si preparano 5 diluizioni del campione, in serie geometrica e piuttosto spaziate tra loro. La serie 100 %, 10 %, 1 %, 0,1 % e 0,01 % (v/v) può essere suggerita per questo scopo. Ad ogni diluizione vengono esposti 5 neonati di *M. bahia* e dopo un periodo non superiore alle 24 h si registrano gli effetti.

Se con lo stesso campione si dovrà in seguito condurre la prova definitiva, si raccomanda di procedere nel rispetto dei limiti di conservabilità del campione stesso. Se viceversa le due prove sono condotte con campioni prelevati in momenti diversi, a causa della variabilità più o meno elevata della tossicità dello scarico o del recettore, i risultati del saggio preliminare e di quello definitivo potranno essere tra loro anche molto differenti.

4.2 - Saggio definitivo

Per la conduzione della prova definitiva si allestiscono 5 diluizioni del campione da esaminare. La sequenza 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 % e 6,25 % (v/v) caratterizzata da un fattore di diluizione 0,5 è applicabile a gran parte delle situazioni. Viceversa, basandosi anche sulle informazioni eventualmente ottenute dal saggio preliminare, si potrà adottare un diverso intervallo di sperimentazione, un diverso fattore di diluizione o anche un maggior numero di concentrazioni.

Se è stato necessario refrigerare i campioni di scarico o di acqua di diluizione, i volumi necessari alla conduzione del saggio vengono prelevati dai contenitori, previo accurato mescolamento, e portati alla temperatura di 20 ± °C. Preparate le diluizioni previste con le eventuali correzioni di salinità, si misura la concentrazione di ossigeno disciolto e se questa risultasse prossima al limite del 60% del valore di saturazione si procede ad aerare i contenitori (cfr. 3.7 "Ossigeno disciolto"). Quando le soluzioni hanno raggiunto le condizioni indicate si introducono i giovani di *M. bahia*.

Nel saggio di tossicità acuta i risultati ottenuti dalle diverse repliche vengono solitamente combinati ai fini del calcolo della LC_{50}. Ciò rende inutile l'allestimento di più repliche della stessa concentrazione, che pertanto non verrà suggerito, a meno che non venga saggiato un numero di organismi superiore a quello minimo indicato.

Per ogni diluizione di effluente si utilizzano almeno 10 giovani organismi in soluzioni di 200 mL di volume. Gli organismi vengono distribuiti secondo una sequenza casuale nei diversi contenitori sino al completamento del numero richiesto. Per evitare diluizioni significative delle soluzioni del saggio, è opportuno minimizzare il volume d'acqua trasferito con gli organismi. Questi sono trasferibili più facilmente se la pipetta provvista di bulbo elastico, è mantenuta verticale sopra l'organismo da prelevare, piuttosto che frontalmente o posteriormente allo stesso.

Quando il saggio è protratto a 96 h, dopo 48 h di esposizione si deve provvedere al rinnovo delle soluzioni del campione saggiato. Il rinnovo quotidiano si può rendere necessario se l'effetto tossico è causato da sostanze facilmente degradabili o quando l'eventuale aerazione dei campioni causa una riduzione significativa degli effetti tossici. Per preparare le soluzioni fresche si procede secondo le condizioni precisate a proposito dell'allestimento della prova. I giovani di *M. bahia* sono trasferiti nelle soluzioni corrispondenti a quelle in cui sono già stati esposti nelle precedenti 24 - 48 h di saggio.

In generale, è opportuno limitare l'evaporazione delle soluzioni di saggio per non causare variazioni della salinità oltre che della concentrazione degli inquinanti. Per controllare il fenomeno si possono usare dei fogli di polietilene trasparenti o altri dispositivi (vetro d'orologio), con i quali coprire i recipienti di saggio.

Almeno quotidianamente si ispezionano i giovani crostacei, e si provvede alla rimozione e registrazione degli organismi eventualmente deceduti. Sono considerati deceduti quegli organismi che non reagiscono ad una leggera stimolazione. Per evitare di disturbare gli animali, si può fare coincidere l'osservazione degli effetti con la somministrazione del cibo e le altre operazioni collegate

alla conduzione del saggio.

È utile disporre dei risultati dopo 24, 48, 72 e 96 h di esposizione, e può essere anche utile, ai fini della caratterizzazione del campione, registrare ogni altra alterazione che sia osservabile negli organismi esposti.

Gli esemplari di *M. bahia* sopravvissuti alla sperimentazione non possono essere riutilizzati ed inoltre, appartenendo ad una specie non indigena, non devono essere assolutamente dispersi nell'ambiente.

5 - PROCEDURA DI SAGGIO SENZA DILUIZIONE (CORPO IDRICO)

5.1 - Saggio definitivo

La soluzione che viene comunemente adottata per individuare la presenza di effetti tossici acuti nelle acque del corpo idrico, consiste nell'esporre dei giovani di *M. bahia* ad un campione non diluito di tali acque.

Se l'acqua di allevamento ha salinità diversa da quella del campione da saggiare, si procede ad acclimatare i crostacei secondo le indicazioni date in Appendice. Si tenga presente che il saggio acuto può essere condotto entro un intervallo di salinità molto ampio e cioè 5-35 ‰. L'acqua usata per completare l'acclimatazione degli organismi, sia che si tratti di acqua naturale che di acqua sintetica, verrà anche utilizzata per allestire il controllo.

A differenza del saggio su effluenti, il campione di acqua del corpo idrico è saggiato in quattro repliche ed altrettante devono essere quelle preparate con l'acqua di controllo. In ogni replica, avente il volume di 200 mL, vengono trasferiti 10 giovani individui di *M. bahia* di età < 5 giorni. Fatta eccezione per questa parte della metodologia di saggio, tutti gli altri aspetti procedurali quali l'aerazione, il rinnovo delle soluzioni o l'alimentazione, sono da considerare invariati e si rimanda, pertanto, ai paragrafi precedenti.

Nel saggio senza diluizione i risultati delle quattro repliche non vengono cumulati e vengono utilizzati per determinare con metodi statistici se sono significativamente diversi da quelli osservati nel controllo.

Se il campione saggiato "tal quale" causa una mortalità superiore al 50 % degli organismi, si può eventualmente procedere alla stima della LC_{50}. In questo caso il campione di acqua del recettore deve essere saggiato secondo la procedura descritta per il saggio con effluente (cfr. par. 4).

6 - VALIDITÀ DEL SAGGIO

Il risultato del saggio è considerato accettabile se la sopravvivenza degli organismi di controllo è ≥ 90% e se la concentrazione di ossigeno si è mantenuta in tutti i trattamenti a livelli ≥ 60% del valore di saturazione.

Pur senza vincolare la validità del risultato, si consiglia la conduzione periodica di saggi in condizioni standard con un tossico di riferimento, quale ad esempio il bicromato di potassio o il pentaclorofenolo. Questa pratica dovrebbe consentire di evidenziare condizioni sperimentali o lotti di organismi, per qualche motivo, anomali. In condizioni normali, disponendo di una congrua serie di LC_{50}, il risultato di ogni nuovo saggio di riferimento dovrebbe collocarsi entro l'intervallo definito dal valore medio di tale serie e dal doppio della corrispondente deviazione standard (media ± 2 DS). Viceversa, se la LC_{50} del tossico di riferimento si colloca all'esterno di questo intervallo di sicurezza, tutti i dati ottenuti con il medesimo lotto di organismi dovrebbero essere considerati con cautela.

A scopo puramente informativo, si possono citare i risultati di alcuni studi condotti sul saggio acuto con *M. bahia*, tra cui quelli di un esercizio di intercalibrazione (US EPA, 1985). A quest'ultimo parteciparono 6 laboratori che, operando sia in condizioni statiche che in flusso continuo, saggiarono la tossicità del nitrato di argento e dell'endosulfan. Il coefficiente di variazione risultò, rispettivamente, di 27 e 22 % per il primo tossico e di 62 e 58 % per il secondo. Per il Cr^{+6} è stata determinata una $96hLC_{50}$ di 2.03 mg/L, ed una serie di saggi condotti da due laboratori diede complessivamente un valore medio per la $48hLC_{50}$ di 6 mg/L (n = 8) ed un CV di 21.5 % (20 ‰) (in Goodfellow e Rue, 1989). Una serie di 8 prove condotte con lo stesso tossico di riferimento ma da un solo laboratorio, diede come $48hLC_{50}$ media il valore di 5,12 mg Cr^{+6}/L e come CV 22 % (20 ‰) (in Goodfellow e Rue, 1989). Una serie di 13 saggi condotti parimenti da un unico laboratorio ma utilizzando come tossico il Cd, diede come media delle $96hLC_{50}$ il valore di 0,346 mg/L e come CV 9 % (25 °C, 25 ‰) (US EPA, 1991).

Un più recente esercizio di intercalibrazione, cui parteciparono 14 laboratori che utilizzarono KCl come tossico di riferimento, permise di valutare una $96hLC_{50}$ media di 250 mg KCl/L ed un CV di 36 % (22 °C; 25‰) (US EPA, 1991). Un simile esercizio di intercalibrazione (25 °C; 30 ‰) con lo stesso tossico ma con la partecipazione di un numero ben maggiore di laboratori (n = 61) diede come risultati finali 532 mg KCl/L e 30,1 %, rispettivamente $48hLC_{50}$ media e coefficiente di variazione (US EPA, 1991).

7 - ANALISI DEI RISULTATI

7.1 - Calcolo della LC_{50}

Il saggio per la valutazione della tossicità acuta

descritto in questa procedura si propone non solo l'identificazione delle sorgenti di contaminazione capaci di effetti tossici acuti ma anche la quantificazione della loro potenziale tossicità mediante la stima della concentrazione letale al 50 % degli organismi (LC_{50}) per un dato tempo di esposizione (24-48 h). La determinazione della LC_{50} può essere effettuata con diversi metodi la cui applicabilità è in buona parte dipendente dal tipo di risultati ottenuti, e più precisamente dal numero di effetti parziali osservati, intermedi cioè tra la mortalità 100 % e la mortalità nulla. La valutazione della LC_{50} dovrebbe basarsi sui risultati relativi ad almeno 5 concentrazioni di campione ed un controllo, sebbene molti metodi di analisi possono essere utilizzati con un numero di dati inferiore. Se la massima concentrazione saggiata ha causato una mortalità inferiore al 50 %, non si dovrebbe procedere al calcolo della LC_{50}, il cui valore sarebbe in tal caso poco attendibile. Meglio ripetere il saggio, se possibile, cercando di migliorare la serie delle concentrazioni saggiate. In caso contrario la LC_{50} sarà più correttamente espressa come "maggiore della massima concentrazione sperimentata" (es.: $48hLC_{50} > 80$ %).

Nel metodo di saggio dedicato alla valutazione della tossicità acuta con *Daphnia magna* (IRSA, 1994) sono stati proposti tre diversi metodi, ampiamente validati, atti alla valutazione della LC_{50}. Si tratta del metodo di Litchfield e Wilcoxon, del test binomiale e del metodo probit. Essi sono adeguatamente illustrati nell'ambito del metodo per *D. magna* al quale si rinvia. Infine, è opportuno segnalare che sono disponibili in commercio alcuni programmi per personal computer espressamente dedicati a diversi metodi di analisi statistica di risultati tossicologici: a questi prodotti parimenti si rinvia.

7.2 - Effetti da concentrazione unica

L'esame dei risultati ottenuti saggiando un campione non diluito del corpo idrico è riconducibile alla teoria del confronto tra due campioni. Nel presente schema sperimentale, i decessi osservati nelle repliche del corpo idrico e in quelle del controllo rappresentano i due campioni di dati posti a confronto.

Di fatto, se la mortalità degli organismi esposti al corpo idrico supera il valore del 10 %, e cioè quel limite di decessi accettato come "naturale" in un gruppo di individui di controllo, si può già concludere che il campione contiene inquinanti a concentrazioni tossiche. Tuttavia può essere opportuno dare supporto statistico al risultato del saggio, verificando la cosiddetta ipotesi nulla o zero, e cioè che le medie dei decessi osservati nei due trattamenti siano uguali. Smentire l'ipotesi con un certo grado di probabilità" solitamente P = 0,05, equivale a verificare che la mortalità osservata per gli organismi esposti al corpo idrico è significativa.

Il test "t" è utilizzato per confrontare i due campioni e, dal momento che vi è un'attesa di contaminazione o di mortalità maggiore per il campione del corpo idrico piuttosto che per il controllo, un test unilaterale è generalmente adeguato. L'applicazione del test "t" richiede che le proporzioni di decessi osservati nelle repliche siano distribuite normalmente. Se i dati soddisfano questo requisito è necessario procedere anche alla verifica di omogeneità della varianza dei due gruppi di risultati e solo in caso affermativo è lecito passare all'esame della significatività dei decessi osservati. Se i dati non fossero distribuiti normalmente il problema viene comunemente risolto mediante opportune trasformazioni dei dati stessi. La conversione delle proporzioni di organismi deceduti nella radice quadra del loro arc sen è la trasformazione più comune. Se non si rivelasse risolutiva è necessario procedere all'esame dei risultati con metodi non parametrici. Se, a sua volta, la condizione di omogeneità della varianza non fosse rispettata, il test "t" rimane valido ma deve essere applicato in forma modificata. Il valore calcolato per la funzione "t" è infine confrontato con il valore critico di "t" individuabile in apposite tabelle, in base al numero di gradi di libertà ed al livello di probabilità prescelto. Se il valore di "t" calcolato supera il valore tabellare le due mortalità sono significativamente diverse. Fortunatamente sono disponibili in commercio dei programmi per personal computer che sono espressamente dedicati all'analisi statistica di risultati tossicologici e possono svolgere tutte le operazioni necessarie. A questi prodotti, pertanto, si rinvia.

APPENDICE

A1- Note sulla sistematica e biologia di *Mysidopsis bahia*

I Misidacei sono piccoli crostacei che popolano le acque marine, le estuariali e, con un numero ridotto di specie, anche le acque dolci. Sono confondibili a prima vista con degli stadi giovanili di gamberi e quindi con i Crostacei Decapodi. Essi appartengono, tuttavia, a un diverso superordine, quello dei Peracaridi, ed essenzialmente si differenziano dai Decapodi per avere il carapace mai perfettamente aderente a tutti i segmenti toracici, per la presenza nelle femmine di un "marsupio" formato da

alcuni oostegiti (porzione setolosa di arti addominali), e per la mancanza di una vera e propria metamorfosi (COTTIGLIA, 1983). L'ordine dei Misidacei è rappresentato nelle acque nazionali da varie specie. Tra quelle che si possono catturare in ambienti lagunari la più comune è *Mysis slabberi* che unitamente ad altre, come *Diamysis bayrensis*, sostano poco sopra il substrato o in rapporto con questo, potendo rappresentare una frazione notevole del popolamento planctonico solo nelle ore notturne di intensa attività natatoria (COTTIGLIA, 1983). La riproduzione avviene in primavera ed estate. I Misidacei costituiscono negli ambienti estuariali e marini un importante anello della catena trofica essendo predati da numerose specie di pesci, spesso di valore commerciale.

M. bahia è una specie estuariale che si riscontra principalmente in acque con salinità superiori al 15 ‰. È originaria della costa atlantica dell'America del nord e del Golfo del Messico in particolare.

Similmente agli organismi del genere *Daphnia*, anche in *Mysidopsis* gli stadi giovanili si sono spesso dimostrati come i più sensibili alle sostanze tossiche. Quando i giovani schiudono e abbandonano la camera di incubazione a marsupio, sono immobili. Essi conducono vita planctonica per le prime 24 - 48 h, dopo le quali raggiungono il fondo, si orientano verso la corrente e si cibano di detrito e di piccoli organismi che da questa sono trasportati.

Gli individui adulti di *M. bahia* hanno lunghezza compresa tra 4,4 e 9,4 mm, misurata dal margine anteriore del carapace sino al termine degli uropodi, aventi aspetto laminare (Fig. 1). Le femmine adulte sono normalmente di dimensioni maggiori dei maschi ed i loro pleopodi (appendici addominali) hanno dimensioni minori (Fig. 2). Il corpo è solitamente trasparente ma può presentare colorazioni tendenti al giallo, bruno o nero.

A2 - Allevamento degli organismi

Per ottenere un rifornimento adeguato dei giovani individui per i saggi, la coltura di *M. bahia* deve essere attivata almeno quattro settimane prima del periodo di utilizzo. Gli organismi necessari ad iniziare la coltura di laboratorio devono provenire da centri specializzati che ne garantiscano l'identità specifica. Sono trasportabili in bottiglie di polietilene ad una densità consigliata di circa 50 individui in 700 mL di acqua di mare, in contenitore da 1 L. Per evitare crescite batteriche ed eccessive riduzioni dell'ossigeno disciolto, durante il trasporto che non deve prolungarsi oltre le 24 h, gli animali non vengono alimentati e si area a saturazione il mezzo acquoso prima della loro immissione.

Le colture massive possono essere mantenute sia in

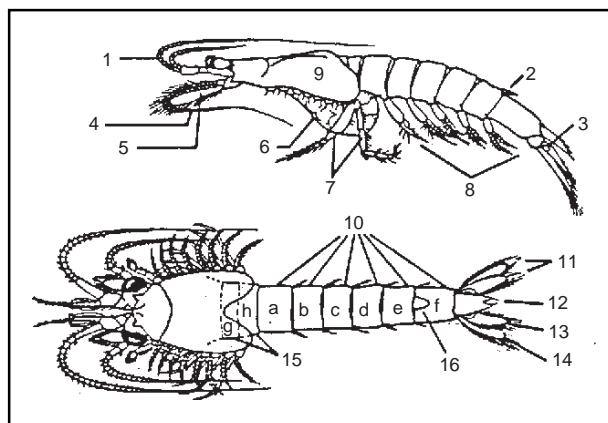



Fig. 1 - Visione laterale e dorsale di un misidaceo (modificata da US EPA, 1991). 1: antennula; 2: processo dorsale; 3: statocisti; 4: antenna; 5: lamina dell'antenna; 6: marsupio; 7: ottavo arto toracico; 8: pleopodi; 9: carapace; 10: segmenti addominali; 11: uropode; 12: telson; 13: endopodite; 14: esopodite; 15: segmenti toracici; 16: processo dorsale.

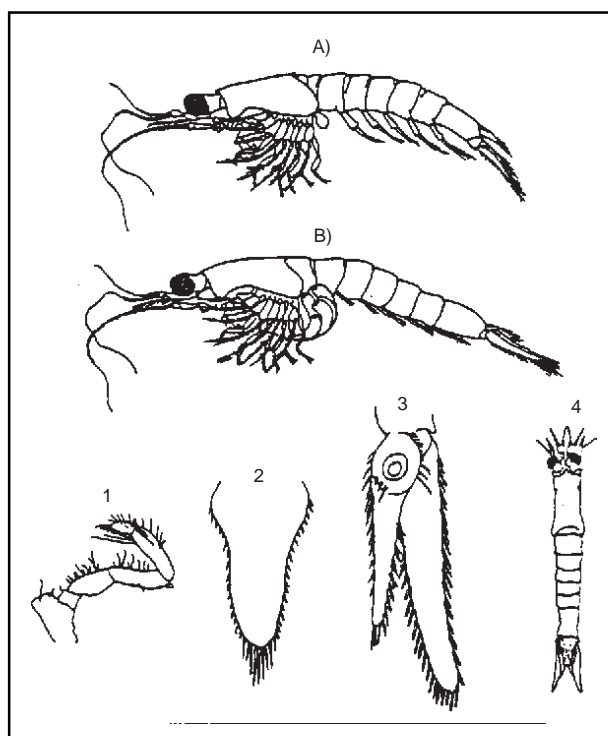



Fig. 2 - Principali caratteristiche morfologiche utili all'identificazione di *Mysidopsis bahia*. A: maschio; B: femmina, si noti la sacca ventrale a marsupio e la minore lunghezza dei suoi pleopodi rispetto a quelli del maschio; 1: secondo arto toracico; 2: telson; 3: uropode destro con statocisti, visto dal dorso, si notino le tre spine sull'endopodite; 4: visione dorsale di individuo maschio.

flusso continuo che in sistemi chiusi provvisti di ricircolo del mezzo acquoso. Quest'ultima soluzione è probabilmente la più diffusa.

Il sistema di mantenimento dovrebbe consistere di almeno 3 - 4 vasche di circa 200 L ciascuna. Tuttavia, possono essere utilizzate anche vasche più piccole aventi un volume di circa 80 -100 L. Disporre di più di una unità di mantenimento tutela dal rischio di perdere l'organismo in caso di possibili incidenti e garantisce un adeguato numero di individui per la sperimentazione. L'intensità della luce ed il fotoperiodo non sembrano avere un ruolo chiave su accrescimento e riproduzione. Sono adottabili, pertanto, intensità luminose comprese tra 500 e 1000 lux con l'alternanza di 16 h luce e 8 h di buio, e cioè quei valori già impiegati con successo per l'allevamento in laboratorio di altri organismi acquatici. *M. bahia* non sopravvive per lunghi periodi a concentrazioni di ossigeno disciolto inferiori a 5 mg/L. Se l'ossigeno disciolto approssima tali valori è necessario aerare le vasche di allevamento con diffusori a pietra porosa ed aria priva di contaminanti. Gli acquari devono essere provvisti sia di un tipo di filtro interno, posizionato sotto lo strato di ghiaietto (dolomite) con cui si copre il fondo detto "filtro sotto sabbia", che di una unità filtrante esterna alla vasca la cui pompa deve essere dimensionata in modo da garantire un flusso orario minimo pari ad almeno il volume dell'acquario (nell'arco di un'ora tutta l'acqua contenuta nell'acquario deve essere stata trattata dall'unità di filtrazione). Tra i vari materiali di riempimento impiegati nell'unità filtrante esterna (carbone, fibre sintetiche etc.) si consiglia di includere uno strato di sbriciolato di conchiglie, reperibile in commercio, che sciogliendosi lentamente contribuisce al potere tampone del mezzo acquoso.

Il flusso di ritorno dal filtro esterno dovrà formare una corrente moderata all'interno della vasca rispetto alla quale gli organismi, che sono caratterizzati da una reotassia positiva, possono orientarsi. L'azione dei filtri non si deve affatto limitare alla rimozione meccanica del materiale in sospensione ma deve estendersi, aspetto ben più importante, alla depurazione dei cataboliti disciolti. Affinché le unità filtranti siano in grado di svolgere questa funzione è necessario un periodo di condizionamento. Si possono aggiungere a giorni alterni alcuni mL di sospensione concentrata di artemie alla vasca da condizionare, almeno fino a che i nitriti non raggiungono la concentrazione di 2 mg/L. Essa continuerà ad aumentare senza ulteriori aggiunte di artemie per poi diminuire lentamente fino a valori inferiori a 0,05 mg/L. A questo punto si può riprendere la somministrazione dei piccoli crostacei o comunque di materiale organico facilmente degradabile, e verificare che la concentrazione di nitriti, misurata giornalmente, non subisca incrementi significativi. Se l'unità accetta l'aggiunta di artemie o altro materiale organico senza sostanziali mutamenti del contenuto di nitriti, il condizionamento è compiuto. Si possono quindi introdurre alcuni organismi adulti di *M. bahia*, non più di una ventina. L'assenza di decessi nell'arco di 96 h conferma la raggiunta funzionalità dell'unità di allevamento. L'aggiunta di alcuni litri di acqua o di parte del materiale filtrante proveniente da un'unità già operativa, può abbreviare notevolmente il processo di condizionamento descritto.

A3 - Acqua di allevamento

Una fonte di acqua di mare non contaminata e filtrata (0,45 - 1 μm) dovrebbe essere usata per l'allevamento di *M. bahia*, tuttavia, alcune miscele artificiali di sali sono state utilizzate con pieno successo come ad esempio quella commercializzata come Forty Fathoms®. Se si utilizza quest'ultima soluzione, è importante attenersi alle istruzioni fornite con le confezioni di sali che verranno solubilizzati in acqua Milli-Q®, deionizzata di buona qualità o equivalenti, in contenitori dedicati a questo scopo e non direttamente nelle vasche di coltura. Prima dell'impiego, è preferibile che l'acqua sintetica sia aerata moderatamente per 24 h e lasciata in quiete per alcuni giorni. Per la coltura degli organismi si può adottare una salinità compresa tra 20 e 30 ‰, ed è consigliato il valore di 25 ‰. È da preferire una salinità più bassa, ma pur sempre ≥ 20 ‰, se si prevede che larga parte dei saggi sarà condotta con salinità inferiori al 25 ‰.

Come già accennato, un processo molto importante nell'allevamento di organismi in sistemi chiusi è la conversione dell'ammoniaca in nitriti e di questi in nitrati per azione dei batteri nitrificanti. Per la corretta conduzione dell'allevamento di *M. bahia* le concentrazioni da non superare sono pari, indicativamente, a 0,05 - 0,1 mg/L di NH_3 totale, 0,05 mg NO_2/L e 20 mg NO_3/L (US EPA, 1988; LUSSIER *et al.*, 1988). Alcuni prodotti distribuiti come kit colorimetrici si prestano ad un pratico controllo di routine di questi parametri.

La rimozione di ammoniaca e nitriti ad opera dei batteri, comporta una riduzione del valore di pH e quindi una diminuzione del potere tampone del mezzo acquoso. Questo viene comunemente ripristinato con aggiunta di Na_2CO_3 o $NaHCO_3$. L'aggiunta non deve essere tuttavia indiscriminata, in quanto elevati valori di alcalinità possono danneggiare l'attività riproduttiva. Gli interventi correttivi per pH e alcalinità, devono essere dimensionati in modo che il valore di quest'ultima sia compreso tra 90 e 120 mg $CaCO_3$/L (WARD, 1989).

Sebbene sia stata osservata una buona attività riproduttiva anche con pH 7,5, si raccomanda di mantenere valori superiori a pH 7,8 ricorrendo all'impiego controllato di $NaHCO_3$ e rinnovi frequenti del mezzo. Valori di pH compresi nell'intervallo 8 ± 0,2-0,3 sono da considerare ottimali, e si consiglia il rinnovo settimanale del 20-30 % dell'acqua delle vasche.

A4 - Alimentazione

I Misidacei sono onnivori (LUSSIER *et al.*, 1989), in quanto oltre alla cattura di copepodi o di altri organismi dello zooplancton, sono in grado di filtrare alghe e di cibarsi del detrito organico, integrando pertanto la dieta in vario modo. È stato osservato che in corrispondenza della abbondante crescita di diatomee che caratterizza solitamente una vasca dopo varie settimane di funzionamento, si verifica anche un evidente aumento del numero di giovani di *M. bahia*, i quali apparentemente si nutrono nel o del feltro di alghe che riveste le pareti e che, pertanto, non dovrebbe mai essere rimosso completamente nei periodici interventi di pulizia. Alcune diatomee del genere *Skeletonema* sono state somministrate come integratore della dieta, ed il rotifero *Brachionus plicatilis* si è dimostrato, a sua volta, una ottima fonte di cibo per i giovani di *M. bahia* (LUSSIER *et al.*, 1989).

La frequente somministrazione di cibo vivo è assolutamente necessaria per prevenire fenomeni di cannibalismo. I naupli di *Artemia salina*, si prestano ottimamente a questo scopo.

Almeno una volta al giorno i misidacei devono essere nutriti con naupli vivi di *A. salina*. La quantità di artemie deve essere tale da assicurare che nelle vasche ve ne siano sempre presenti per evitare che gli adulti di *M. bahia* predino la propria prole o gli altri individui della vasca. Sono state utilizzate con successo quantità di cibo pari a 2-3 artemie per mL di acqua o anche pari a 150 artemie per individuo ogni giorno. Se, com'è consigliabile, si somministra il cibo due volte al giorno, si dimezza il numero di artemie fornite (circa 75/individuo). Viceversa se dopo poche ore non residuassero naupli nella vasca è preferibile aumentarne la quantità, adeguandola alla densità ed alla velocità riproduttiva della coltura. L'incremento della quantità di cibo non deve causare tuttavia la riduzioni della concentrazione dell'ossigeno disciolto, nè intorbidamento da crescite batteriche diffuse o altri eventi che indichino il decadimento della qualità dell'ambiente di allevamento. È altresì importante controllare che l'unità di filtrazione non abbia un flusso tale da rimuovere essa stessa i naupli di artemia prima che questi possano essere predati.

A5 - Idoneità della dieta

In particolari condizioni ambientali *A. salina* produce delle uova (cisti) quiescenti che permangono vitali per lunghi periodi di tempo, purché conservate all'asciutto e in condizioni anaerobie (ASTM, 1992). La resistenza dello stadio quiescente fa si che esso possa essere facilmente trasportato e commercializzato, e grazie alla sua praticità, venire ampiamente utilizzato in acquacoltura e in acquariologia per nutrire molti organismi acquatici. Reidratando le cisti in acqua di mare, dopo circa 24 h ne schiudono i naupli al primo stadio di sviluppo. Le varietà geografiche e le corrispondenti fonti commerciali di uova di *Artemia* sono numerose; tuttavia è stato osservato che il contenuto di contaminanti, le dimensioni del nauplio e la composizione in acidi grassi, differiscono ampiamente, influendo sulla idoneità del prodotto quale fonte di cibo (WARD, 1987; ASTM, 1992). Le cisti provenienti dal Brasile o dalla Columbia si sono dimostrate idonee sia per la modesta contaminazione che per le dimensioni adeguatamente ridotte delle giovani larve (US EPA, 1988). Anche altre aree di provenienza possono comunque rivelarsi adeguate, ma in ogni caso, l'unico modo di valutare l'accettabilità di una varietà di cisti è di condurre prove di alimentazione grazie alle quali si possono esaminare gli effetti su sopravvivenza, crescita e attività riproduttiva di *M. bahia*. Analogamente, anche se il fornitore rimane lo stesso, è necessario che ciascun nuovo lotto di cisti venga saggiato per verificarne l'idoneità. In entrambi i casi, si procede come segue: si conducono in parallelo due saggi cronici di 7 giorni, per ciascuno dei quali sono utilizzate 8 repliche di 5 organismi ognuna. Il primo gruppo di 40 misidacei viene alimentato con i naupli di *Artemia* giudicati a suo tempo idonei e che hanno pertanto valore di riferimento, il secondo gruppo viene invece nutrito con i naupli schiusi dal lotto in esame. La frequenza di somministrazione del cibo, la sua quantità, il volume dei recipienti e dell'acqua di mare in essi contenuta e tutto quanto caratterizza il saggio non deve essere modificato rispetto alla procedura di saggio cronico. La nuova fonte di cibo viene considerata idonea se non si osservano differenze statisticamente significative tra i due trattamenti relativamente a sopravvivenza, crescita e riproduzione. Ogni nuovo lotto dovrebbe anche essere analizzato per il contenuto di pesticidi organoclorurati e PCB. Se questi superano complessivamente la concentrazione di 0,3 μg/g (peso fresco), le cisti di *Artemia* non dovrebbero essere utilizzate (US EPA, 1988). È quindi buona norma effettuare le necessarie analisi su un piccolo quantitativo di cisti, e nel caso si ottengano i risultati attesi, si può procedere all'acquisto di un lotto di notevoli dimensioni che potrà servire per diversi anni (ASTM, 1992).

A6 - Preparazione della dieta

Un imbuto separatore con un volume di 2 L costituisce un pratico contenitore per la schiusa delle cisti. Si utilizza 1 L di acqua di mare naturale o sintetica ma anche una soluzione contenente 35 g di NaCl si presta allo scopo. Si aggiungono 10 mL di cisti di *Artemia* e si area intensamente con un tubetto di vetro posizionato in modo che la sua estremità sia sul fondo dell'imbuto. Il tempo di schiusa varia in relazione all'area geografica di provenienza e alla temperatura di incubazione. Tuttavia, con una temperatura di 27 °C le uova dovrebbero schiudere in circa 24 h. Dopo tale periodo si arresta l'aerazione e i gusci ormai vuoti si portano in superficie mentre i naupli si raccolgono sul fondo dal quale vengono prelevati mediante apertura del rubinetto dell'imbuto. Sfruttando la fototassia positiva delle larve, la raccolta può essere agevolata oscurando la parte superiore dell'imbuto. Tale operazione non deve protrarsi oltre i 5-10 minuti in quanto l'elevata concentrazione di organismi raggiunta sul fondo del contenitore fa si che, sospeso il gorgogliamento, l'ossigeno disciolto venga rapidamente esaurito provocando la morte dei naupli. L'apertura alterna del rubinetto dell'imbuto separatore consente di rimuovere a più riprese i naupli appena schiusi. Questi verranno filtrati e se necessario risciacquati o concentrati in mezzo fresco con l'aiuto di un contenitore col fondo di rete (maglie di 150 µm).

Il nauplio di artemia è incapace di nutrirsi di fonti di cibo esterne per un periodo di circa 24 ore dalla schiusa (25 °C), durante le quali utilizza le riserve di tuorlo di cui è provvisto. In questo arco di tempo il valore nutrizionale e calorico del nauplio decadono progressivamente, e pertanto si consiglia di utilizzarlo subito dopo la schiusa o comunque entro le 2-6 ore dal T_{90}, e cioè da quando il 90 % delle cisti è schiuso (ASTM, 1992). Grazie alla ripetibilità del tempo necessario alla schiusa delle numerose varietà di *Artemia* (a temperatura costante), l'idratazione delle cisti può essere effettuata in base al momento giudicato più opportuno per la raccolta e la somministrazione dei naupli appena schiusi. A parità di altre caratteristiche tossicologiche e nutrizionali, la ridotta dimensione del nauplio deve costituire il criterio guida nella scelta della fonte commerciale di *A. salina*, pena l'impossibilità per i giovani di *M. bahia* di catturare la preda e quindi di nutrirsi adeguatamente (LUSSIER *et al.*, 1988).

La necessità di fornire cibo vivo quotidianamente all'allevamento dei misidacei, può rendere utile l'impiego di sistemi automatizzati che, in assenza del personale tecnico (fine settimana), idratano le cisti di *Artemia* e somministrano i naupli alle vasche. In breve, si tratta di congegni artigianali, nei quali un temporizzatore controlla il deflusso, per gravità, di un certo volume di acqua di mare al contenitore con le cisti da idratare, e similmente, dei naupli alla vasca, quando la schiusa è completata (SCHIMMEL e HANSEN,1975; WARD, 1984).

A7- Riproduzione

Nelle colture di laboratorio *M. bahia* raggiunge la maturità sessuale in 12 - 20 giorni in relazione alla temperatura dell'acqua ed alla dieta. A differenza di quanto accade nei generi *Daphnia* o *Ceriodaphnia* le uova non si sviluppano se non fecondate. L'accoppiamento ha luogo di notte e dura pochi minuti. Affinché si abbia una attività riproduttiva soddisfacente la temperatura delle vasche di allevamento deve essere mantenuta tra 24 e 26 °C. Normalmente le uova sono presenti negli ovari delle femmine a circa 12 giorni dalla schiusa (Fig. 3) e la camera di incubazione a marsupio è completamente sviluppata negli organismi di circa 15 giorni di età, corrispondenti a circa 5 mm di lunghezza corporea (Fig. 4). I neonati sono liberati a 17-20 giorni. Il numero di uova deposte nel marsupio ed il numero dei giovani prodotti per ogni schiusa dipendono in modo diretto dalle condizioni ambientali e dalle dimensioni della femmina che ha una schiusa ogni 4-7 giorni. Femmine adulte (8-9 mm) mantenute in acqua naturale o sintetica (Forty Fathoms®) producono mediamente 11 ± 6 larve allo stadio III (l'ultimo prima della nascita).

L'attività riproduttiva dei misidacei può risultare

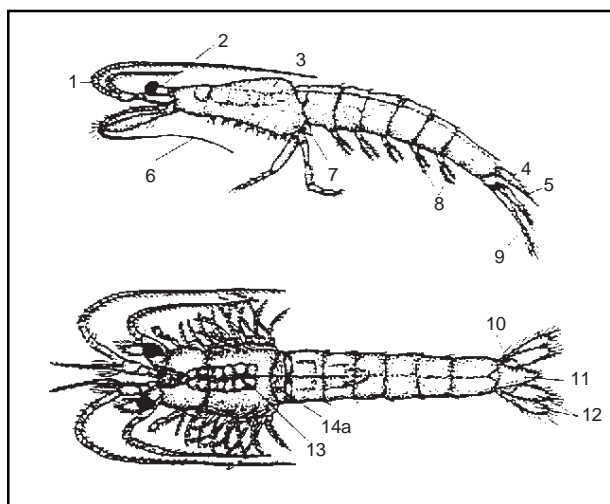



Fig. 3 - Femmina adulta di *M. bahia* con uova in sviluppo negli ovidotti (modificata da LUSSIER *et al.*, 1987). 1: antennula; 2: occhio peduncolato; 3: carapace; 4: statocisti; 5: telson; 6: antenna; 7: marsupio in sviluppo; 8: pleopodi; 9: uropode; 10 statocisti; 11: telson; 12: uropodi; 13: ovidotti con uova; 14a: marsupio in sviluppo.

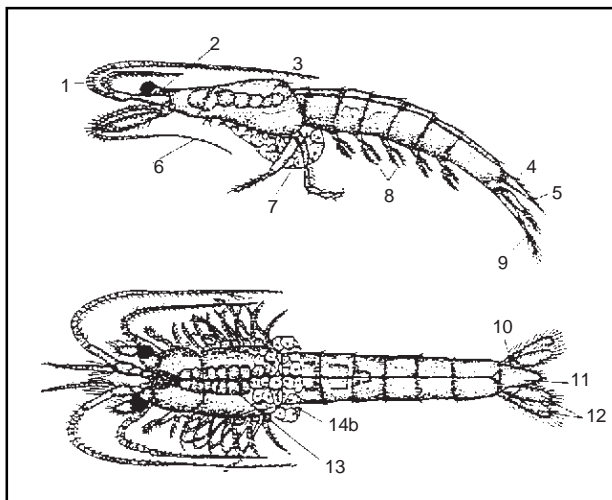



Fig. 4 - Femmina adulta di *M. bahia* con uova negli ovidotti ed embrioni in sviluppo nella sacca a marsupio (modificata da LUSSIER *et al.*, 1987). 1: antennula; 2: occhio peduncolato; 3: carapace; 4: statocisti; 5: telson; 6: antenna; 7: marsupio con embrioni; 8: pleopodi; 9: uropode; 10 statocisti; 11: telson; 12: uropodi; 13: ovidotti con uova; 14b:marsupio con embrioni.

inibita se nelle vasche si raggiungono condizioni di sovraffollamento. Pertanto, fatta eccezione per i periodi di massima necessità di neonati, è opportuno rimuovere, con cadenza regolare, una parte degli individui presenti nelle vasche. Il valore di densità consigliato non deve superare i 20 misidacei/L, pena l'inibizione dell'attività riproduttiva. Tuttavia, al fine di un corretto dimensionamento della coltura, è opportuno considerare anche l'ampiezza del fondo della vasca e non solo il suo volume.

A causa della abitudine parzialmente bentonica dell'organismo, è stato infatti proposto che ogni individuo abbia a disposizione circa 30 cm^2 di superficie (ASTM, 1996). Il popolamento lasciato ad evoluzione spontanea è caratterizzato da una crescente dominanza numerica degli individui di sesso maschile. È quindi consigliabile controllare la densità di questi ultimi piuttosto che dell'intero popolamento in modo indiscriminato, favorendo un rapporto tra i sessi di circa 2:1 (femmine: maschi). La continua raccolta di giovani individui è fonte di stress per la coltura di *M. bahia* e ciò è dovuto, fondamentalmente, alla frequente manipolazione degli organismi. Anche per questo motivo è preferibile mantenere contemporaneamente più vasche. Alternando la raccolta degli individui necessari ai saggi, si permette alle colture non in uso di beneficiare di un periodo di ripresa. Se la frequenza dei saggi impone una continua richiesta di larve, è opportuno mantenere, indicativamente, almeno quattro vasche da 200 L ciascuna.

La registrazione dei dati di produttività di ciascuna coltura permetterà di decidere il momento in cui la coltura potrà essere scartata. Spesso, dopo tre o più mesi, la coltura può entrare in fase di senescenza e la produzione di larve risultare pressoché annullata. Al contrario, quando tutte le condizioni sono favorevoli, più della metà delle femmine adulte dovrebbe avere delle uova nella camera di incubazione (ASTM, 1990).

È opportuno non attendere la fase di senescenza ma garantire la continuità dell'allevamento allestendo nuove vasche con organismi (50-100, per vasche fino a 100 L) prelevati da colture in attiva fase riproduttiva, meglio se da colture diverse, al fine di favorire l'eterogeneità del patrimonio genetico. A tale scopo la periodica introduzione di organismi provenienti da altri allevamenti, o meglio, da più popolazioni naturali, è fortemente raccomandata. Gli individui di *M. bahia* ottenuti da fonti esterne, devono essere mantenuti separati dall'allevamento ed in osservazione per un paio di settimane, onde minimizzare il rischio di introdurre degli agenti patogeni. Nelle operazioni di trasferimento, gli organismi non devono essere esposti a cambiamenti di salinità e di temperatura che siano superiori, rispettivamente, a 2 - 3 ‰ e a 2-3 °C in 24 h.

A8 - Pulizia e disinfezione

Quando una vasca è in funzione da alcuni mesi, anche se mantenuta correttamente, evidenzia un accumulo di materiale organico (artemie non consumate, metabolismo di *M. bahia* e crescita di organismi sulle superfici sommerse della vasca). La pulizia periodica per sifonamento, che si può far coincidere con i rinnovi parziali dell'acqua di coltura, verrà sostituita in questo caso da un riallestimento della vasca, che prevede il risciacquo della ghiaia e dei supporti filtranti e il rinnovo totale dell'acqua di mare (adeguatamente condizionata se artificiale). È da escludere l'uso di detergenti e di disinfettanti, se non dopo morie, eventi patologici o la comparsa di idrozoi nelle vasche di coltura. In questo caso è necessario scartare i misidacei che presentino dei polipi sul corpo, mentre gli acquari dovranno essere accuratamente lavati con detergenti e acqua calda. A ciò si farà seguire un trattamento con acido (10% HCl) e numerosi risciacqui con acqua deionizzata.

A9 - Organismi per il saggio

Diverse sono le soluzioni per ottenere le giovani larve necessarie al saggio. Se è richiesto un controllo accurato dell'età degli organismi, è preferibile isolare delle femmine adulte di *M. bahia* con l'anticipo, rispetto

all'allestimento del saggio, dettato dalla procedura metodologica. In questo caso, con l'aiuto di un retino con maglie di 2 mm, che trattenga cioè solo gli adulti, si isola nella vasca di coltura un gruppo di organismi dal quale vengono prelevate quelle femmine gravide le cui uova mostrino la macchia oculare degli embrioni in sviluppo. Con una pipetta ad ampio diametro (4-5 mm) e provvista di bulbo elastico per l'aspirazione, si trasferiscono le femmine prescelte in un bicchiere (4 L), con il fondo di rete (1-2 mm), a sua volta sospeso in un imbuto separatore a bocca larga (Fig. 5). Grazie a questo dispositivo i neonati appena schiusi cadono attraverso la rete nell'imbuto sottostante dal quale, aprendo il rubinetto, potranno venire raccolti in un cristallizzatore o in un recipiente provvisto a sua volta di un fondo di rete (300 µm), utile per concentrare o risciacquare gli organismi.

Un'altra soluzione simile alla precedente, consiste nel trasferire le femmine gravide in un ampio retino (maglia di 2-3 mm), del tipo usato in aquariologia, che è mantenuto sospeso in una vasca di 8 L contenente almeno 4 L di acqua. In entrambi i casi, gli adulti vengono nutriti un paio di volte al giorno con naupli di *A. salina* secondo i criteri già descritti. Generalmente è necessario aerare le vasche di schiusa, sia per mantenere la concentrazione di ossigeno disciolto al di sopra del 60 % della saturazione e sia per mantenere il cibo in sospensione. I neonati schiusi nell'arco di 24 h dall'isolamento delle femmine hanno età ± 24 h, e possono essere usati per i saggi di tossicità acuta fino al compimento del quinto giorno di età. Il numero di femmine gravide da isolare può essere conteggiato adottando una stima prudenziale di un adulto ogni due neonati richiesti. Al fine di accelerare il rilascio della prole, può essere vantaggioso mantenere nelle camere di schiusa una temperatura leggermente più elevata rispetto a quella di allevamento, preferendo valori di 26-27 °C. Dopo un massimo di 48 h di permanenza nella camera di schiusa, le femmine vengono riportate alla vasca di coltura massiva.

Fig. 5- Dispositivo per l'isolamento.di femmine gravide e la raccolta di neonati (modificata da LUSSIER *et al.*, 1987). 1: deflusso; 2: bicchiere con fondo di rete; 3: imbuto separatore; 4: cristallizzatore, 5: recipiente con fondo e pareti di rete.

Si possono citare altre due tecniche per ottenere i neonati necessari al saggio, anche se offrono minori garanzie sull'età degli organismi, rispetto alle due precedenti.

La prima, descritta da NEITSEMA e NEFF (1980) o anche da LUSSIER *et al.* (1988), consiste nell'applicazione di una sorta di aspiratore per sifonamento, ad un vasca di allevamento. Il retino posto sulla presa di questo sifone, ha maglie tali da escludere gli individui adulti, che pertanto non vengono rimossi dalla vasca, permettendo invece la raccolta dei soli stadi giovanili. Questo sistema, che talvolta è indicato come "mysid generator", mette a disposizione, giornalmente, un certo numero di neonati, raccolti in una apposita camera esterna alla vasca di allevamento.

Il secondo metodo per ottenere dei giovani esemplari di *M. bahia*, consiste, semplicemente, nel prelevare con un retino un gruppo di organismi dalla vasca di allevamento, trasferirli ad un cristallizzatore (2 L) e con l'aiuto di un piano luminoso e di un reticolo con quadrati da 2 mm, selezionare quegli individui aventi lunghezza inferiore a 2 mm, che dovrebbero avere un'età di circa 24 ore.

Se non usati immediatamente, i neonati di *M. bahia* vengono mantenuti in una vasca, di dimensione adeguata al loro numero, e nutriti secondo i criteri già esposti. A questo scopo si utilizzano generalmente vasche di volume ridotto (10 - 20 L), mantenute in aerazione moderata, con un ricambio di almeno il 50 % del mezzo ogni 48 h. Questo periodo di mantenimento, che è fissato in un tempo massimo di cinque giorni dalla schiusa, può essere utilizzato, per completare l'acclimatazione degli organismi alle condizioni di saggio.

BIBLIOGRAFIA

ASTM (1990). Standard guide for conducting lifecycle toxicity tests with saltwater Mysids. *American Society for Testing and Materials*, ASTM E 1191 -90.

ASTM (1992). Standard practice for using brine shrimp nauplii as food for test animals in aquatic toxicology. *American Society for Testing and Materials*, ASTM E 1203-92.

ASTM (1996). Standard guide for conducting lifecycle toxicity tests with saltwater Mysids. *American Society for Testing and Materials*, ASTM E 1191-90 (Revision).

COTTIGLIA, M. (1983). Crostacei Decapodi lagunari. Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque lagunari e costiere italiane. In "Guide per il riconoscimento delle specie animali nelle acque interne italiane", *CNR, P. F. "Promozione della Qualità dell'Ambiente"*, n.10, AQ/11225, pp.149.

GOODFELLOW, W.L. e W.J. RUE (1989). Evaluation of a chronic estimation toxicity test using *Mysidopsis bahia*. In "Aquatic Toxicology and Hazard Assessment", 12th vol. ASTM STP 1027, U.M. Cowgill and L.R. Williams, Eds., *American Society for Testing and Materials*, Philadelphia: 333-344.

IRSA (1994). 8020 - Metodi di valutazione della tossicità con *Daphnia*. In "Metodi analitici per le acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*: 100, 336-342.

LUSSIER S.M., A. KUHN e J. SEWALL (1987). Guidance manual for conducting seven day mysid survival/growth/reproduction study using the estuarine mysid, *Mysidopsis bahia*. Contribution No. X106. In: Schmmel, S.C., ed. "Users guide to the conduct and interpretation of complex effluent toxicity tests at estuarine/ marine sites", *Environmental Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency*, Narragansett, Rhode Island. Contribution No. 796, 265 pp.

LUSSIER S.M., A. KUHN, M.J. CHAMMAS e J. SEWALL (1988). Techniques for the laboratory culture of *Mysidopsis* species (Crustacea: Mysidacea). *Environ. Toxicol. Chem*., **7**: 969-977.

REITSEMA L.A. e J.M. NEFF (1980). A recirculating artificial seawater system for the laboratory culture of *Mysidopsis bahia* (Crustacea; Pericaridea). *Estuaries*, **3**: 321-323.

RICHARDS, F.A. and N. CORWIN (1956). Some oceanographic applications of recent determinations of the solubility of oxygen in seawater. *Limnol. Oceanogr*., **1**: 263-267.

SCHIMMEL S.C. e D.J. HANSEN (1975). An automatic brine shrimp feeder for aquatic bioassays. *J. Fish. Res. Board Can.*, **32**: 314-316.

US EPA (1985). Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. W. H. Peltier C.I. Weber, *U.S. Environmental Protection Agency*, Report EPA/ 600/485/013, Cincinnati, OH.

US EPA (1988). Mysid (*Mysidopsis bahia*) survival, growth and fecundity tests, Method 1007. In "Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms", C.I. Weber, W.B. Horning, D.J. Klemm, T.W. Neiheisel, P.A. Lewis, E.L. Robinson, J. Menkedick e F. Kessier, eds. EMSL, *US Environmental Protection Agency*, Cincinnati, OH, EPA-600/4-87-028.

US EPA (1991). Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. C.I. Weber, *U.S. Environmental Protection Agency*, Report EPA/600/4-90/027, Cincinnati, OH.

WARD S.H. (1984). A system for laboratory rearing of the mysid, *Mysidopsis bahia* Molenock. *Progr. Fish-Cult*., **46**: 170-175.

Ward S.H. (1987). Feeding response of the Mysid - *Mysidopsis bahia* reared on Artemia. *Progr. Fish Cult.*, **49**: 29-33.

WARD S.H. (1989). The requirements for a balanced medium in toxicological experiments using *Mysidopsis bahia* with special reference to calcium carbonate. In "Aquatic Toxicology and Hazard Assessment", 12th vol. ASTM STP 1027. U.M. Cowgill and L.R. Williams eds., *American Society for Testing and Materials*, Philadelphia, 402-412.

OSSERVAZIONI E QUESITI

Nell'ambito delle attività di supporto tecnico-scientifico all'azione di verifica del rispetto delle normative riguardanti la qualità delle acque svolta dal laboratori di controllo segnaliamo, tra le lettere pervenute in istituto che sollevano quesiti sul piano tecnico normativo e/o richiedono chiarimenti su taluni aspetti delle metodologie IRSA, quella del dr. Giaconi, direttore del Dipartimento Provinciale di Pisa dell'Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale della Toscana (ARPAT).

Nella lettera vengono richieste delucidazioni relativamente alle condizioni di stabilizzazione del campione, riportate in una tabella generale, inserita nella sezione del manuale "Metodi Analitici per le Acque (IRSA, 1994) dedicata ai metodi di campionamento, nel caso dell'analisi di metalli e alla loro armonizzazione con le prescrizioni della legge 10 maggio 1976, n. 319.

Come giustamente evidenziato nella suddetta lettera, le modalità di stabilizzazione consigliate per i metalli totali, vale a dire l'addizione di 5 mL/L di acido nitrico 1:1 per litro di campione, sono applicabili a quel gruppo di metalli (As, Cd, Cr^{VI}, Hg, Ni, Pb, Cu. Se, Zn) per i quali la legge 319 prevede la determinazione dell'elemento "in soluzione come ione, sotto forma di complesso, ed in sospensione". Per gli altri metalli (Al, Ba, B, Cr^{III}, Fe, Mn, Sn) che hanno un limite riferito all'elemento "in soluzione come ione, sotto forma di complesso, ed in sospensione dopo sedimentazione di 2 ore", non si possono applicare le condizioni di stabilizzazione precedentemente indicate, nè quelle previste per i metalli disciolti (filtrazione sul posto su membrana da 0,45 µm e addizione di 3 mL/L di acido nitrico 1:1).

L'apparente lacuna può essere superata considerando che la tabella in questione ha una valenza del tutto generale, non ancorata a specifici riferimenti normativi mentre informazioni più precise e dettagliate si possono trovare al paragrafo "Campionamento e conservazione del campione" di ogni singolo metodo. I metodi 3090, 3120 e 3200 relativi alla determinazione del ferro, manganese e stagno, rispettivamente, riportano una nota a piè di pagina in cui vengono fornite le modalità di trattamento del campione nel caso in questione. In particolare si prescrive che l'aggiunta di acido nitrico (5 mL/L di campione) venga fatta dopo la decantazione. Dette modalità vanno ovviamente estese anche agli altri metalli (Al, Ba, B, Cr^{III}).

Nella lettera si chiede inoltre se la stabilizzazione debba essere effettuata sul surnatante in fase di prelievo, dopo aver eseguito la sedimentazione sul posto, o in laboratorio sempre sul surnatante dopo la determinazione dei solidi sedimentabili. Detto quesito riveste una notevole importanza nell'ambito del territorio pisano, in virtù dell'elevato numero di controlli da eseguire nei confronti degli insediamenti conciari, nei cui scarichi viene sistematicamente effettuata la determinazione del cromo trivalente. Si ritiene che l'operazione di stabilizzazione possa essere condotta in laboratorio dopo l'esecuzione dei solidi sedimentabili, entro 24 ore dal momento del prelievo. Intervalli di tempo superiori sono sconsigliati in quanto potrebbero comportare alterazioni dei campioni con variazioni significative dei solidi sedimentabili e, quindi, delle concentrazioni dei metalli sul surnatante, portando a determinazioni non rispondenti allo spirito della norma. Tali indicazioni discendono da considerazioni di ordine pratico e dalla consapevolezza della difficoltà di fornire condizioni standardizzate che tengano conto delle differenti caratteristiche di stabilità proprie delle diverse tipologie di effluente.

Bollettino C.I.S.B.A. n. 6/1996

Autorizzazione del Tribunale di Reggio Emilia n. 837 del 14 maggio 1993

proprietario
Paola Manzini
(Presidente del Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale)

direttore responsabile
Rossella Azzoni

REDAZIONE

Rossella Azzoni	responsabile di redazione
Giuseppe Sansoni	responsabile grafico
Roberto Spaggiari	responsabile di segreteria

Numero chiuso in redazione il 20/12/1996

Il **C.I.S.B.A.** - Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale si propone di:

- divenire un punto di riferimento nazionale per la formazione e l'informazione sui temi di biologia ambientale, fornendo agli operatori pubblici uno strumento di documentazione, di aggiornamento e di collegamento con interlocutori qualificati
- favorire il collegamento fra il mondo della ricerca e quello applicativo, promuovendo i rapporti tecnico-scientifici con i Ministeri, il CNR, l'Università ed altri organismi pubblici e privati interessati allo studio ed alla gestione dell'ambiente
- orientare le linee di ricerca degli Istituti Scientifici del Paese e la didattica universitaria, facendo della biologia ambientale un tema di interesse nazionale
- favorire il recepimento dei principi e dei metodi della sorveglianza ecologica nelle normative regionali e nazionale concernenti la tutela ambientale.

Per iscriversi al **C.I.S.B.A.** o per informazioni scrivere al:
Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale,
via Amendola 2, 42100 Reggio Emilia
o telefonare al Segretario: *Roberto Spaggiari*
tel. 0522/295460 – 0338/6252618; fax 0522/295446

Quote annuali di iscrizione al Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale: socio ordinario: £ 70.000; socio collaboratore £ 50.000; socio sostenitore £ 600.000.
conto corrente postale n. 10833424 intestato a: CISBA, RE

I soci ricevono il bollettino ***Biologia Ambientale*** e vengono tempestivamente informati sui corsi di formazione e sulle altre iniziative del **C.I.S.B.A.**

Gli articoli originali e altri contributi vanno inviati alla Redazione:
Rossella Azzoni Gastaldi, via Cola di Rienzo, 26 - 20144 Milano.

I dattiloscritti, compreso il materiale illustrativo, saranno sottoposti a revisori per l'approvazione e non verranno restituiti, salvo specifica richiesta dell'Autore all'atto dell'invio del materiale.

Le opinioni espresse dagli Autori negli articoli firmati non rispecchiano necessariamente le posizioni del **C.I.S.B.A.**

Stampa ROTOPACK via Degola 7/A, REGGIO EMILIA

INDICE 1987-1996

Legenda:
IN MAIUSCOLETTO GLI AUTORI; **in grassetto il Titolo**; [tra parentesi quadre il numero e l'anno di pubblicazione su Biologia Ambientale]

ARTICOLI

Bioindicatori

CASARINI P., CAMERINI G., CARBONE M. **Agricoltura ed alterazioni della fauna del suolo**. [BA 3-4/90]

NIMIS P.L., CASTELLO M. **L'uso dei licheni nel biomonitoraggio dell'inquinamento atmosferico**. [BA 2/90]

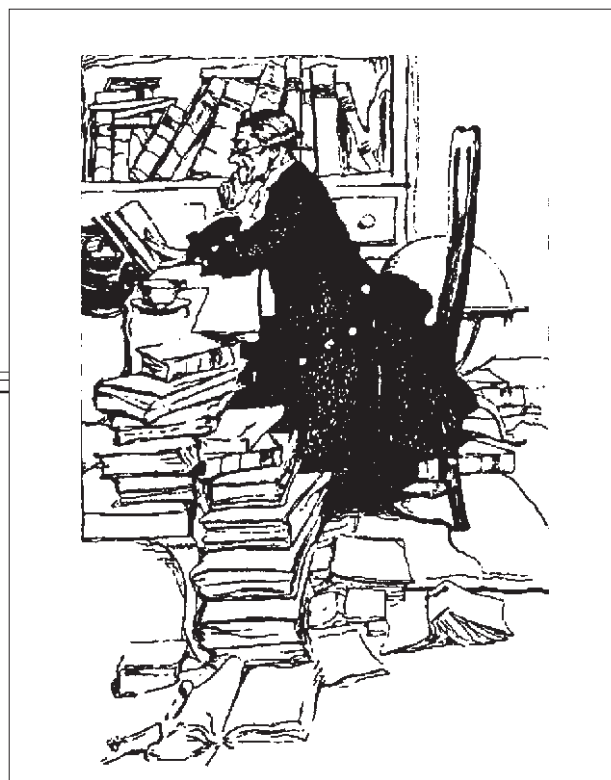
TURIN P., WEGER M. **Le macrofite acquatiche come indicatori biologici di qualità delle acque**. [BA 3-4/91]

MERCORELLI S. **Valutazione della presenza di ozono troposferico nel versante narnese della "Conca ternana" mediante l'uso di *Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3**. [BA 6/92]

BRAGALONI M., GARROU E., PUCCINELLI P. **Verifica di una metodica di monitoraggio dell'inquinamento atmosferico con piante di interesse forestale in ambiente urbano e suburbano**. [BA 3-4/93]

SILIGARDI M., MAIOLINI B. **L'inventario delle caratteristiche ambientali dei corsi d'acqua alpini. Guida all'uso della scheda RCE-2**. [BA 2/93]

BELTRAME V., SPAGGIARI R., TURINA G. **Prima definizione di una scheda per l'inventario delle caratteristiche ambientali dei corsi d'acqua mediante fotointerpretazione**. [BA 6/93]

GENONI P., CERANA D. **Qualità biologica del Naviglio Grande a valle di alcuni scarichi in due diverse condizioni di portata**. [BA 6/95]

MORPURGO M. **Descrizione sintetica del Saprobienindex**. [BA 2-3/96]

MORPURGO M. **Confronto fra Indice Saprobico (Friedrich e DIN, 1990) e Indice Biotico Esteso (Ghetti e IRSA, 1995)**. [BA 2-3/96]

CESARONI D., D'ERCHIA V. **Attività perossidasica in conifere utilizzate per il monitoraggio dell'inquinamento in ambiente urbano**. [BA 1/96]

Depurazione

MONTANINI E., ANTONIETTI R. **Allevamento di organismi acquatici detritivori con i fanghi di depuratori biologici**. [BA 1/90]

MADONI P. **I Protozoi Ciliati dei fanghi attivi: aggiornamenti tassonomici e di nomenclatura**. [BA 1/91]

EGADDI F. **Ruolo della fitodepurazione nell'abbattimento dei nutrienti.** [BA 6/91]

AZZONI R. **Contributo alla conoscenza della microfauna che colonizza il fango attivo**. [BA 6/95]

Facchini S., Sarra P.G. **Tipizzazione dei microrganismi filamentosi nei sistemi di trattamento SBR (Sequencing Batch Reactor)**. [BA 5/96]

Ecologia

Feletti M., Gaiter S. **Appunti sulle comunità biologiche delle acque sotterranee**. [BA 4/96]

Bodon M., Gaiter S. **Considerazioni sul popolamento macrobentonico delle acque sorgive**. [BA 2/89]

Gestione ambientale

Olivieri E. **Uso del suolo e qualità delle acque correnti: i corsi d'acqua della costa centrale toscana**. [BA 3/89]

Antonietti R. **Elementi di ecologia per la gestione ed il controllo degli ambienti lacustri**. [BA 5/90]

Nature Conservancy Council **La conservazione dei fossi e degli stagni agricoli**. [BA 6/90]

Mancini L., Volterra L. **Il controllo delle macrofite acquatiche infestanti**. [BA 2/92]

Baldini U., Beltrame V., Lupatelli G. **Un atlante al servizio dell'agricoltura**. [BA 1/93]

Simmons S.A., Barker A. **Zone umide urbane per il controllo delle acque meteoriche e per la conservazione della natura**. [BA 1/94]

Antonietti R., Lucchetti M., Marchiani C., Montanini E., Zucchelli M.V. **Confronto tra approcci idraulico-ingegneristici ed ecologici nella definizione del deflusso minimo vitale: il caso del torrente Gotra**. [BA 2/95]

Scoccianti C. **Metodi di salvaguardia delle migrazioni di anfibi minacciate dal traffico stradale**. [BA 2-3/96]

Tinarelli R., Marchesi F. **Inserto "Zone Umide"**. [BA 5/96]

Siligardi M., Cadonna M., Ciutti F. **Indagine sulla capacità demolitiva della sostanza organica del fiume Adige attraverso l'uso di leafpack**. [BA 1/96]

Igiene ambientale

Rivosecchi L. **Artropodi di interesse sanitario e protezione della natura in Italia**. [BA 2/88]

Pasini G., Ercolini C., Palmieri F., Fisichella S. **Moria ittica nel fiume Magra (1990): cause e concause**. [BA 5/91]

Celli G., Bellini R. **Impatto ambientale e sanitario di due insetticidi comunemente impiegati nella lotta contro le larve di zanzara: temephos e *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis***. [BA 3-4/92]

Volterra L. **La potabilizzazione delle acque eutrofiche**. [BA 1/92]

Venier P. **Gli inquinanti genotossici in ambiente marino**. [BA 3-4/94]

Costi C., Romani F. **Effetto della disinfezione su *Aeromonas hydrophila* in acque da destinarsi al consumo umano**. [BA 2/94]

Bodon M., Gaiter S. **Nuovi criteri di valutazione, basati sulla componente biologica, per la captazione di acque destinate al consumo umano**. [BA 1/95]

Tessari P., Ciutti F., Gasperini M. **Indagine sulla dermatite del bagnante nel lago di Garda**. [BA 2/95]

Ercolini C., Fisichella S., Serracca L., Teneggi E., Terrarollo A. **Monitoraggio di *Francisella tularensis* nella provincia della Spezia: il cinghiale quale animale sentinella**. [BA 2-3/96]

Baldaccini G., Gianchecchi U. ***Metcalfa pruinosa*, un fitofago in rapida espansione sul territorio nazionale**. [BA 1/96]

Buzzanca G., Quaglia G.M., Torri L. **Il fenomeno della corrosione dei materiali metallici utilizzati nelle reti acquedottistiche**. [BA 6/94]

Volterra L. **La formazione di biofilm e biofouling**. [BA 6/94]

Fontani N., Pedroni M. **I batteri implicati nei fenomeni di corrosione**. [BA 6/94]

Bernabei S., Volterra L. **Macroinvertebrati colonizzanti il biofilm**. [BA 6/94]

Mancini L., Volterra L. **Particolato abiotico e microfite rinvenibili nelle reti acquedottistiche**. [BA 6/94]

Volterra L. **Metodi di prevenzione e contenimento di biofilm e biofouling**. [BA 6/94]

Igiene urbana

Malfatti P. **Controllo guidato di topi e ratti nelle aree urbane e suburbane**. [BA 1/89]

Malfatti P. **Controllo di blatte e formiche nell'ambiente urbano**. [BA 4/89]

Sgobba D., Piccinini R. **Il controllo delle blatte in un ambiente ospedaliero**. [BA 1/90]

de Carneri I., Di Matteo L. **Uova di elminti nei fanghi dei depuratori di liquami urbani**. [BA 6/90]

Gianchecchi U. **Insetti parassiti delle alberature cittadine: processionaria del pino e tingide del platano**. [BA 3-4/91]

Baldaccini N.E. **Le popolazioni urbane di storno e di colombo: notizie biologiche e possibilità di controllo**. [BA 2/91]

Baldaccini G.N. **Culicidi: note di biologia, ecologia, control-**

Impatto ambientale

Legislazione

Metodi

Rinaturalizzazione

Saggi tossicologici

Tossine algali

Varie

ATTUALITÀ

L'INTERVISTA

NATUROPA

PAGINE APERTE

SEGNALAZIONI

Fiumi & C.

MANZINI, SPAGGIARI (ed.). **Ecologia dell'ambiente fluviale**. *Prov. RE, USL 9 RE, CISBA*, 1986. [BA 1/87]

SILIGARDI (ed.). **Esperienze e confronti nell'applicazione degli indicatori biologici in corsi d'acqua italiani**. *Prov. Aut. Trento, CISBA*, 1986. [BA 1/87]

GHETTI. **I macroinvertebrati nell'analisi di qualità dei corsi d'acqua: indice biotico E.B.I. modif. Ghetti**, 1986. *Prov. Aut. Trento*, 1986. [BA 1/87]

DI GIROLAMO, MANCINI. **Indici biotici per la valutazione della qualità delle acque: un approccio alle tecniche di campionamento e di elaborazione dei dati**. *Istisan*, 1986. [BA 2/87]

MARCHETTI. **L'eutrofizzazione. Un processo degenerativo delle acque**. *Angeli*, Milano, 1987. [BA 3/87]

SANSONI et al. **Corsi d'acqua del litorale apuano: effetti inquinanti della polvere di marmo**. *Com. Mont. Apuane*, 1983. [BA 3/87]

Mappaggio biologico: strumento di valutazione della qualità delle acque correnti: Esperienze toscane. *Reg. Toscana*, 1987. [BA 3/87]

BALDACCINI et al. **Mappaggio biologico di qualità dei corsi d'acqua della Versilia. La Versilia nei dati del catasto scarichi**. *Amm. Prov. LU*, 1986. [BA 3/87]

SANSONI. **Speciale Magra: come si devasta un parco fluviale**. *(in proprio)*, 1987. [BA 4/88]

BALDACCINI, BIANUCCI. (eds.). **La palude del lago di Massaciuccoli: indagine idrobiologica in relazione all'attività di escavazione**. *Parco Migliarino-S. Rossore-Massaciuccoli*, 1988. [BA 4/88]

BROOKES. **Recommendations bearing on the sinuosity of Danish stream channels**. *Nat. Agency Envir. Protection*, 1984. [BA 1/89]

I fiumi italiani e le calamità artificiali. *Reg. Piemonte*, 1988. [BA 4/89]

PROV. ROMA. **Acque imprigionate. Impatto ambientale ed alternative alla canalizzazione dei corsi d'acqua**. *Coop. Ecologia*, 1988. [BA 1/89]

COMITATO DIFESA LEDRA. **Progetto Ledra. Convegno sulla conservazione e manutenzione degli ecosistemi fluviali**. *Comitato Difesa Ledra*, 1988. [BA 1/89]

FORNERIS. **Gli incubatoi di valle. Problemi connessi con i ripopolamenti tradizionali e nuove proposte metodologiche**. *Prov. Torino*, 1989. [BA 3/89]

La qualità delle acque superficiali (Atti convegno Riva del Garda, 28-29 apr. 1988). *Prov. Aut. Trento*, 1989. [BA 5/89]

COLER, ROCKWOOD. **Water pollution biology: a laboratory/ field handbook**. *Technomic Publ.*, 1990. [BA 2/90]

Naturalizzazione dei fiumi: protezione e difesa dei corsi d'acqua. *Pàtron*, Bologna, 1990. [BA 2/92]

GORDON et al. **Stream hydrology. An introduction for ecologists**. *Wiley & Sons*, 1992. [BA 2/92]

CARLING (ed.). **Lowland floodplain rivers. Geomorphological perspectives**. *Wiley & Sons*, 1992. [BA 2/92]

GARDINER (ed.). **River project and conservation. A manual for holistic appraisal**. *Wiley & Sons*, 1991. [BA 2/92]

RHEINHEIMER. **Aquatic microbiology**. *Wiley & Sons*, 1991. [BA 2/92]

WARD. **Aquatic insect ecology. I - Biology and habitat**. *Wiley & Sons*, 1992. [BA 2/92]

BOON et al. (ed.). **River conservation and management**. *Wiley & Sons*, 1991. [BA 2/92]

PETTS (ed.). **Historical change of large alluvial rivers**. *Wiley & Sons*, 1989. [BA 2/92]

DOMENICO. **Physical and chemical hydrogeology**. *Wiley & Sons*, 1991. [BA 2/92]

BROOKES. **Channelized rivers. Perspectives for environmental management**. *Wiley & Sons*, 1988. [BA 2/92]

WALESH. **Urban surface water management**. *Wiley & Sons*, 1989. [BA 2/92]

STARKEL (ed.). **Temperate palaeohydrology. Fluvial processes in the temperate zone during the last 15000 years**. *Wiley & Sons*, 1991. [BA 2/92]

STUMM (ed.). **Aquatic chemical kinetics. Reaction rates of processes in natural waters**. *Wiley & Sons*, 1990. [BA 2/92]

BILLI (ed.). **Dynamic of gravel-bed rivers**. *Wiley & Sons*, 1992. [BA 2/92]

MITSCH (ed.). **Ecological engineering. An introduction to ecotechnology**. *Wiley & Sons*, 1989. [BA 2/92]

NRIAGU (ed.). **Aquatic toxicology and water quality management**. *Wiley & Sons*, 1988. [BA 2/92]

BRESSAN, GODINI. **Alghe del golfo di Trieste. Guida allo studio**.

(in proprio), 1992. [BA 3-4/92]

Il bacino idrografico come unità di analisi ecologica. *Comitato difesa Ledra*, Udine, 1992. [BA 6/92]

MARTINO (ed.). **Tutela e gestione degli ambienti fluviali**. *WWF*, Roma, 1992. [BA 1/93]

GHETTI. **Manuale per la difesa dei fiumi**. *Fondaz. G. Agnelli*, Torino, 1993. [BA 2/93]

Regulated rivers. Research and management. *Wiley & Sons*, 1993. [BA 5/93]

CANNATA. **Governo dei bacini idrografici. Strumenti tecnici e pianificatori**. *ETAS*, Milano, 1994. [BA 2/94]

SANSONI, GARUGLIERI. **Il Magra. Analisi, tecniche e proposte per la tutela del fiume e del suo bacino idrografico**. *WWF Lunigiana*, 1994. [BA 2/94]

CAMPAIOLI et al. **Manuale per il riconoscimento dei macroinvertebrati delle acque dolci italiane** (vol. 1). *Prov. Aut. Trento*, 1994. [BA 5/94]

Studi sulle artropodocenosi terrestri di ambienti umidi. *Museo St. Nat*. Ferrara, 1994. [BA 1/95]

BORETTI et al. **I fontanili di Corte Valle Re. Una riserva orientata**. *Reg. Em.-Romagna, Prov. RE*, 1994. [BA 2/95]

SANSONI. **Idee per la difesa dai fiumi e dei fiumi. Il punto di vista ambientalista**. *Centro Doc. Pistoia*, 1995. [BA 6/95]

AIPIN. **Sistemazioni in ambito fluviale**. *Il Verde Ed.*, Varese, 1995. [BA 1/96]

CALOW P., PETTS G.E. (eds.). **The rivers handbook**. *Blackwell*, Oxford, 1994. [BA 5/96]

Depurazione

MADONI et al. (eds.). **Analisi della microfauna per il controllo di qualità degli impianti biologici di depurazione**. *USL 9 RE, AGAC RE, CISBA*, 1987. [BA 2/87]

MADONI. **I Protozoi Ciliati nel controllo di efficienza dei fanghi attivi**. *CISBA, USL 9 RE, AGAC RE*, 1988. [BA 4/88]

Approccio biologico alla depurazione dei liquami: stato attuale e prospettive. *Centro L. Bazzucchi, CISBA, IAPWPRC*, 1990. [BA 6/90]

SPIGONI et al. (ed.). **I principali microrganismi filamentosi del fango attivo. Caratteristiche ecologiche e metodi di identificazione**. *AGAC*, Reggio Emilia, 1992. [BA 3-4/92]

BECCARI et al. **Rimozione di azoto e fosforo dai liquami**. *Hoepli*, Milano, 1993. [BA 5/93]

VISMARA et al. **La regolazione dei processi biologici per impianti a fanghi attivi. Manuale operativo e guida alla diagnosi**. *Ing. Amb.*, 1991. [BA 5/93]

BONADONNA et al. **Valutazione della contaminazione microbiologica di fanghi di depurazione di reflui civili: problemi legati alle metodiche di analisi**. *Istisan*, Roma, 1994. [BA 2/95]

Tossicologia

Revised report on fish toxicity testing procedures. *E.I.F.A.C.*, 1983. [BA 3/87]

RAND, PETROCELLI. (eds.). **Fundamentals of aquatic toxicology. Methods and applications**. *Hemisphere, McGraw-Hill*, 1985. [BA 4/88]

PETERS, DE BERNARDI. ***Daphnia***. *Ist. It. Idrobiologia*, 1987. [BA 4/89]

New horizons in Ecotoxicology. *Blackwell*, Oxford, 1991. [BA 3-4/91]

HUTSON (ed.). **Environmental fate of pesticides**. *Wiley & Sons*, 1990. [BA 2/92]

CALOW (ed.). **Handbook of ecotoxicology**. *Blackwell*, Oxford, 1993-4. [BA 1/96]

Igiene urbana

Il controllo dei roditori nocivi nelle aree verdi urbane. *Comune Viareggio*, 1988. [BA 4/88]

MONTERMINI (ed.). **L'Infantria in Italia**. *Consorzio Fitosan. Reggio Emilia*, 1994. [BA 1/95]

Ambiente & Ecologia

Relazione sullo stato dell'ambiente nella provincia di Modena: 1° aggiornamento. *Prov. Modena*, 1988. [BA 2/89]

CERUTTI. **Il rischio alimentare**. *Tecniche Nuove*, 1989. [BA 3/89]

PASQUALINI SALSA. **Il diritto dell'ambiente**. *Sole 24 ore*, 1988. [BA 4/89]

Gli abitanti di Reggio Emilia e l'ambiente. *Comune Reggio Emilia*, 1985. [BA 2/90]

Morte biologica o ritorno alla natura?. *WWF Abruzzo*, 1990. [BA 6/90]

NICOLAI **La scienza della bioindicazione**. *ENEA*, Roma, 1992. [BA 6/92]

MASSARUTTO. **Economia del ciclo dell'acqua. Regolamentazione ambientale ed economica nei servizi pubblici**. *F. Angeli*, Milano, 1993. [BA 5/93]

MARCHETTI (ed.). **Ecologia applicata**. *CittàStudi*, Milano, 1993. [BA 5/93]

L'acqua in casa. Come ridurre gli sprechi, smettere d'inquinarla e migliorarne la qualità. *Consorzio Risorse Idriche*, Firenze, 1995. [BA 6/95]

Evoluzione

STANLEY. **L'evoluzione dell'evoluzione: un nuovo calendario per l'origine delle specie**. *Mondadori*, 1982. [BA 2/89]

ELDREDGE, TATTERSALL. **I miti dell'evoluzione umana**. *Boringhieri*, 1984. [BA 2/89]

BOCCHI, CERUTI. **Modi di pensare postdarwiniani: saggio sul pluralismo evolutivo**. *Dedalo*, 1984. [BA 2/89]

CERUTI. **Il vincolo e la possibilità**. *Feltrinelli*, 1986. [BA 2/89]

GOULD. **Il pollice del panda: riflessioni sulla storia naturale**. *Ed. Riuniti*, 1983. [BA 2/89]

GOULD. **Quando i cavalli avevano le dita: misteri e stranezze della natura**. *Feltrinelli*, 1984. [BA 2/89]

GOULD. **Questa idea della vita: la sfida di Charles Darwin**. *Ed. Riuniti*, 1985. [BA 2/89]

GOULD. **Il sorriso del fenicottero**. *Feltrinelli*, 1987. [BA 2/89]

SERMONTI, FONDI. **Dopo Darwin: critica all'evoluzionismo**. *Rusconi*, 1980. [BA 2/89]

BARBIERI. **La teoria semantica dell'evoluzione**. *Boringhieri*, 1985. [BA 2/89]

KANDUC. **Cenni di evoluzione biochimica**. *Ed. Adriatica*, 1979. [BA 2/89]

LASZLO. **Evoluzione**. *Feltrinelli* , 1986. [BA 2/89]

MONOD. **Il caso e la necessità**. *Mondadori*, 1970. [BA 2/89]

Agricoltura

PERRERA. **Agricoltura. Ambiente, inquinamento e protezione**. *(in proprio)*, 1988. [BA 2/89]

MUIRHEAD-THOMSON. **Pesticide impact on stream fauna with special reference to macroinvertebrates**. *Cambridge Univ. Press*, 1987. [BA 4/89]

CARSON. **Primavera silenziosa**. *Feltrinelli*, 1962. [BA 3-4/90]

COMMONER. **Il cerchio da chiudere**. *Garzanti*, 1972. [BA 3-4/90]

CONTI. **Che cos'è l'ecologia**. *Mazzotta*, 1977. [BA 3-4/90]

CONTI. **Questo pianeta**. *Ed. Riuniti*, 1983. [BA 3-4/90]

TIEZZI. **Tempi storici, tempi biologici**. *Garzanti*, 1984. [BA 3-4/90]

LAPPÈ, COLLINS. **I miti dell'agricoltura industriale**. *Libr. Ed. Fiorentina*, 1977. [BA 3-4/90]

GEORGE, PAIGE. **Storia della fame**. *CLESAV*, 1984. [BA 3-4/90]

FUKUOKA. **La rivoluzione del filo di paglia**. *Libr. Ed. Fiorentina*, 1977. [BA 3-4/90]

Nuovo corso di aggiornamento agro-bionomico. *Assoc. Suolo e Salute*, 1975. [BA 3-4/90]

KOEPF et al. **Agricoltura biodinamica**. *Antroposofica*, 1980. [BA 3-4/90]

Quaderni di biodinamica. *Antroposofica*, (varie pubblicazioni). [BA 3-4/90]

PFEIFFER, RIESE. **Manuale di orticoltura biodinamica**. *Libr. Ed. Fiorentina*, 1985. [BA 3-4/90]

ASSOC. BAVARESE TUTELA NATURA. **L'orto-giardino ecologico**. *Red/studio redazionale*, 1983. [BA 3-4/90]

TRINGALE. **La difesa delle colture ortive con prodotti non tossici**. *La Casa Verde*, 1986. [BA 3-4/90]

MOONEY. **I semi della discordia**. *CLESAV*, 1985. [BA 3-4/90]

CNR. **Prospettive di controllo biologico degli insetti in agricoltura**. *CNR*, 1980. [BA 3-4/90]

FRANZ, KRIEG. **La lotta biologica**. *Edagricole*, 1976. [BA 3-4/90]

BIRCH, HAYNES. **Introduzione ai feromoni**. *CLESAV*, 1984. [BA 3-4/90]

VALLI. **Metodologie di lotta biologica e integrata**. *CLESAV*, 1978. [BA 3-4/90]

VIGGIANI. **Lotta biologica e integrata**. *Liguori*, 1977. [BA 3-4/90]

Gli insetti utili in agricoltura. *Reg. Em.-Romagna*, 1984. [BA 3-4/90]

VAN DE BOSCH, AESCHLIMANN. **La minaccia dei pesticidi**. *Muzzio*, 1989. [BA 3-4/90]

WEIR, SHAPIRO. **La congiura del veleno**. *Dedalo*, 1982. [BA 3-4/90]

Agricoltura biologica in Europa. *La Malalingua*, 1989. [BA 3-4/90]

L'agricoltura alle soglie del 2000. *CLESAV*, 1983. [BA 3-4/90]

STEFANINI. **La risorsa agroverde**. *Datanews*, 1989. [BA 3-4/90]

L'humus, osservatorio agroambientale. *Grifo* (periodico). [BA 3-4/90]

ALTIERI. **Agroecologia. Prospettive scientifiche per una nuova agricoltura**. *Muzzio*, Padova, 1991. [BA 3-4/93]

Guida al riconoscimento degli organismi utili in agricoltura. *Osserv. Agroamb.*, Cesena (FO), 1991. [BA 6/93]

FOHLMANN-RITTER. **La siepe. Compagna della campagna**. *Macro*, Sarsina (FO), 1991. [BA 6/93]

C.R.P.A. **Manuale per la gestione e l'utilizzazione agronomica dei reflui zootecnici**. *Reg. Em.-Romagna*, 1993. [BA 2/95]

Ingegneria genetica

CHERFAS. **Ingegneria genetica: la scienza della vita artificiale**. *Boringhieri*, 1986. [BA 5/89]

RIFKIN. **Dichiarazione di un eretico: il dilemma del nucleare e dell'ingegneria genetica**. *Guerini*, 1988. [BA 5/89]

RIFKIN. **Entropia: una nuova concezione del mondo**. *Mondadori*, 1982. [BA 5/89]

BENATTI et al. (eds.). **Biotecnologie e ambiente**. *UNICOPLI*, 1988. [BA 5/89]

DRLICA. **Introduzione all'ingegneria genetica**. *Garzanti*, 1985. [BA 5/89]

SASSON. **Biotecnologie**. *Calderini*, 1987. [BA 5/89]

Ingegneria naturalistica

SCHIECHTL. **Bioingegneria forestale. Biotecnica naturalistica**. *Castaldi*, Feltre, 1991. [BA 3-4/91]

Manuale tecnico di ingegneria naturalistica. *Reg. Emilia-Romagna e Reg. Veneto*, 1993. [BA 1/94]

Tecniche di ingegneria naturalistica (Video). *Reg. Em.-Romagna*, 1995. [BA 1/96]

Corso di formazione professionale di ingegneria naturalistica. *Reg. Veneto*, 1996. [BA 5/96]

Varie

SPALLANZANI M.F. **La collezione naturalistica di Lazzaro Spallanzani: i modi e i tempi della sua formazione**. *Comune Reggio Emilia*, 1985. [BA 1/90]

Sustainable use of groundwater. *RIVM-RIZA*, 1991. [BA 1/92]

MAZOR. **Applied chemical and isotopic groundwater hydrology**. *Wiley & Sons*, 1990. [BA 2/92]

CASTELLANI (ed.). **La biblioteca della scienza italiana**. *Bibl. Panizzi*, RE, 1994. [BA 3-4/94]

FILIPPI. **Io sto con le vipere. Ricerche sui rettili italiani**. *Ediemme*, Firenze, 1995. [BA 2/95]

INSERTI SPECIALI

Guida Multizonali. CISBA. [BA 5/89].

In un limpido ruscello ... Min. Amb. e Sicur. Nucleare dell'Assia, Rep. Fed. Tedesca. [BA 1/90].

Compatibilità ambientale delle opere fluviali (Relazioni conclusive della commissione ministeriale per il fiume Magra). CISBA [BA 2/90].

Agricoltura e fauna selvatica. Consiglio d'Europa [BA 3-4/90].

Pesci delle acque interne italiane (di Turin P.). CISBA [BA 90-92].

La gestione naturalistica dei fossi (di Newbold C. et al.). Nature Conservancy Council, Association of Drainage Authorities [BA 1-6/93].

Depurazione mediante lagunaggio naturale. Guida tecnica per piccole comunità (di Vuillot M. et al.). Min. Agriculture, CEMAGREF, Paris-Lyon [BA 3-4/93].

Conservazione della natura e ingegneria fluviale (di Newbold et al.). Nature Conservancy Council [BA 2/92].

Indice Biotico Esteso I.B.E. (metodi di analisi per ambienti di acque correnti) (di Ghetti P.F.). IRSA-CNR [BA 6/95].

Saggio di tossicità con *Daphnia* (Atti della giornata di studio, Milano, 29 ottobre 1991). IRSA-CNR, 1991 [BA 5/92].

Biocorrosione. CISBA-AGAC Reggio-Em., 1994 [BA 6/94].

Metodi analitici per le acque. IRSA-CNR, 1994 [BA 3-4/95].

Workshop sui salmonidi italiani (Atti Workshop AIIAD, Trieste, 8 aprile 1994). CISBA-AIIAD, 1995 [BA 5/95].

PUBBLICAZIONI

**realizzate direttamente dal C.I.S.B.A.
o grazie alla sua collaborazione**

Atti del seminario di studi
i biologi e l'ambiente
NUOVE ESPERIENZE PER LA SORVEGLIANZA ECOLOGICA
Reggio Emilia 17-18 febbraio 1983
USL n. 9; Amministrazione Provinciale di Reggio Emilia; CNR - Progetto Finalizzato "Promozione della qualità dell'ambiente".

Atti del seminario di aggiornamento
ECOLOGIA DELL'AMBIENTE FLUVIALE
Reggio Emilia 31 maggio - 1 giugno 1985
USL n. 9; Amministrazione Provinciale di Reggio Emilia.

Atti del convegno
ESPERIENZE E CONFRONTI NELL'APPLICAZIONE DEGLI INDICATORI BIOLOGICI IN CORSI D'ACQUA ITALIANI
S. Michele all'Adige 6-7 settembre 1985
Provincia Autonoma di Trento: Stazione Sperimentale Agraria Forestale, Servizio Protezione Ambiente.

Atti del 1° corso di formazione
ANALISI DELLA MICROFAUNA PER IL CONTROLLO DI QUALITA' DEGLI IMPIANTI BIOLOGICI DI DEPURAZIONE
Reggio Emilia 7-12 ottobre 1985
USL n. 9; Azienda Gas Acqua Consorziale di Reggio Emilia.

P.F. Ghetti, 1986
Manuale di applicazione
I MACROINVERTEBRATI NELL'ANALISI DI QUALITA' DEI CORSI D'ACQUA
Indice Biotico: E.B.I., modif. Ghetti, 1986
Provincia Autonoma di Trento: Stazione Sperimentale Agraria Forestale, Servizio Protezione Ambiente.

Atti del corso di formazione
UTILIZZAZIONE DI *Daphnia magna* IN TOSSICOLOGIA AMBIENTALE
Reggio Emilia 4-9 maggio 1987
USL n. 9; Amministrazione Provinciale di Reggio Emilia.

Atti del convegno
LA QUALITA' DELLE ACQUE SUPERFICIALI
Sessione poster: Le indagini sulla qualità biologica dei corsi d'acqua italiani. Mostra dei risultati
Riva del Garda 28-29 aprile 1988
Provincia Autonoma di Trento.
Atti del convegno
LA QUALITA' DELLE ACQUE SUPERFICIALI
criteri per una metodologia omogenea di valutazione
Riva del Garda 28-29 aprile 1988
Provincia Autonoma di Trento.

G. Sansoni, 1988
ATLANTE PER IL RICONOSCIMENTO DEI MACROINVERTEBRATI DEI CORSI D'ACQUA ITALIANI
Provincia Autonoma di Trento: Stazione Sperimentale Agraria Forestale, Servizio Protezione Ambiente.

P. Madoni, 1988
Atti del corso di formazione
I PROTOZOI CILIATI NEL CONTROLLO DI EFFICIENZA DEI FANGHI ATTIVI
USL n. 9; Azienda Gas Acqua Consorziale di Reggio Emilia.

P. Madoni e L. Cingolani (a cura di), 1988
Atti del corso/convegno
I PROTOZOI CILIATI COME INDICATORI DI QUALITA' DEI PROCESSI DI DEPURAZIONE A FANGO ATTIVO
Dipart. Studi Territoriali ed Ambientali del Centro di Studio Ricerca e Formazione "L. Bazzucchi",Perugia.

P. Turin, 1990-1992
PESCI DELLE ACQUE INTERNE ITALIANE
Schede descrittive
CISBA (inserti di Biologia Ambientale).

Atti della giornata di studio, 1991
SAGGIO DI TOSSICITÀ CON *Daphnia*
Istituto di Ricerca sulle Acque; USL 75/III-Milano; CISBA.

G. Spigoni, C. Davoli, D. Davoli, 1992
I PRINCIPALI MICRORGANISMI FILAMENTOSI DEL FANGO ATTIVO. CARATTERISTICHE ECOLOGICHE E METODI DI IDENTIFICAZIONE
Azienda Gas Acqua Consorziale, Reggio Emilia.

Autori Vari, 1994
Introduzione alla BIOCORROSIONE
CISBA.

Atti del Workshop, 1995
SALMONIDI ITALIANI
Workshop dell'Associazione Italiana Ittiologi di Acqua Dolce, Trieste, 8 aprile 1994
A.I.I.A.D., CISBA. (n° speciale di Biologia Ambientale)

ABSTRACTS

Nota: la scritta tra parentesi quadre, ad es. [BA 1/87: 2] va letta così: Biologia Ambientale n. 1, 1987, abstract n° 2.

Alghe

Bioindicatori

appréciacion de la qualité globale des sédiments lacustres à l'aide d'une analyse simplifiée des malacocénoses. *Annls Limnol., 22 (3): 209-217*. [BA 1/90: 119].

ALEBIC-JURETIC A. *et al.*, 1989. **Air pollution damage to cell membranes in lichens - Results of simple biological test applied in Rijeka, Yugoslavia.** *Water, Air and Soil Pollution, 47: 25-33*. [BA 3-4/91: 194].

GERMUND TYLER, 1989. **Uptake, retention and toxicity of heavy metals in lichens. (A Brief Review).** *Water, Air and Soil Pollution, 47: 321-333*. [BA 3-4/91: 195].

HEAGLE A.S. *et al.*, 1989. **Design and performance of a large, field exposure chamber to measure effects of air quality on plants.** *J. Environ. Qual., 18: 361-368*. [BA 6/91: 215].

WHITEHURST I.T., 1991. **The Gammarus:Asellus ratio as an index of organic pollution.** *Wat. Res., 25 (3): 333-339*. [BA 1/94: 293].

PANATTONI A. *et al.*, 1990. **Identificazione dell'ozono quale agente di sintomi fogliari su fagiolo in Pianura Padana.** *Informatore fitopatologico, 12, 43- 47*. [BA 1/94: 294].

VIOLINI G. *et al.*, 1992. **Damage by ambient ozone to bean leaves. Histological, histochemical and ultrastructural observations.** *Riv. Pat. Veg., 2, 91-110*. [BA 1/94: 295].

BACCI E. *et al.*, 1994. **Marine bacteria as indicators of water quality.** *Chemosphere, 28, 6: 1165-1170*. [BA 1/95: 330].

BONADONNA L. *et al.*, 1993. ***Clostridium perfringens* come indicatore in sedimenti marini.** *Ing. Sanit.-amb., gen.-feb.: 28-30*. [BA 1/95: 332].

GREENWOOD M. T. *et al.*, 1991. **The use of Coleoptera (Arthropoda: Insecta) for floodplain characterization on the River Trent.** *Regulated Rivers: Res. and Manag., 6: 321-332*. [BA 1/95: 334].

Biomanipolazione

SHAPIRO J. *et al.*, 1984. **Lake restoration by biomanipulation: Round Lake, Minnesota, the first two years** *Freshwater Biology, 14: 371-383*. [BA 2/87: 14].

POST J.R. *et al.*, 1987. **The impact of planktivourous fish on the structure of a plankton community.** *Freshwater Biology, 17: 79-89*. [BA 3/89: 84].

DE HAAN H. *et al.*, 1988. **Manipolation of chemistry and phytoplancton by hydrological intervention:a whole lake experiment in the northern Netherlands.** *Freshwater biology, 20: 395-406*. [BA 3-4/92: 226].

MACIEJ GLIWICZ Z., 1990. **Why do cladocerans fail to control algal blooms?** *Hydrobiologia, 200/201: 83-97*. [BA 3-4/92: 227].

DAWIDOWICZ P., 1990. **Effectiveness of phytoplankton control by large-bodied and small-bodied zooplankton.** *Hydrobiologia, 200/201: 43-47*. [BA 3-4/92: 228].

THEISS J. *et al.*, 1990. **Biomanipulation by introduction of herbivorous zzoplankton. A helpful shock for eutrophic lakes?** *Hydrobiologia, 200/201: 59-68*. [BA 3-4/92: 229].

OZIMEK T. *et al.*, 1990. **Can macrophytes be useful in biomanipulation of lakes? The Lake Zwemlust example.** *Hydrobiologia, 200/201: 399-407*. [BA 6/92: 245].

SANNI S. *et al.*, 1990. **Oligotrophication as a result of planktivorous fish removal with rotenone in the small, eutrophic, Lake Mosvatn, Norway.** *Hydrobiologia, 200/201: 263-274*. [BA 6/92: 246].

GALANTI G. *et al.*, 1990. **Biomanipulation of Lago di Candia (Northern Italy): a three-year experience of aquatic macrophyte management.** *Hydrobiologia, 200/201: 409-417*. [BA 6/92: 247].

GOPHEN M., 1990. **Summary of the workshop on perspectives of biomanipulation in inland waters.** *Hydrobiologia, 191: 315-318*. [BA 5/93: 272].

BENNDORF, 1990. **Conditions for effective biomanipulation: conclusions derived from whole-lake esperiments in Europe.** *Hydrobiologia, 200/201: 187-203*. [BA 5/93: 273].

IRVINE K. *et al.*, 1990. **The potential of artificial refugia for maintaining a community of large-bodied cladocera against fish predation in a shallow eutrophic lake.** *Hydrobiologia, 200/201: 379-389*. [BA 5/93: 274].

VAN DONK E. *et al.*, 1990. **Restoration by biomanipulation in a small hypertrophic lake: first-year results.** *Hydrobiologia, 191: 285-295*. [BA 5/93: 275].

Depurazione

TANAKA H. *et al.*, 1985. **Model system of bulking and flocculation in mixed culture of *Sphaerotilus* sp. and *Pseudomonas* sp. for dissolved oxygen deficiency and high loading.** *Water Research, 19 (5): 563-571*. [BA 1/88: 32].

MANSOURI-ALIABADI M. *et al.*, 1985. **Passage of selected heavy metals from *Sphaerotilus* (Bacteria: Chlamidobacteriales) to *Paramecium caudatum* (Protozoa: Ciliata).** *Water Research, 19 (6): 697-699*. [BA 1/88: 34].

KETCHUM L.H. JR. *et al.*, 1987. **A comparison of biological and chemical phosphorous removals in continuous and sequencing batch reactors.** *J.W.P.C.F., 59 (1): 13-18*. [BA 2/88: 38].

WOOMBS M. *et al.*, 1987. **Seasonal species composition, density and role of nematodes in activated-sludge effluent treatment works.** *Water Research, 21 (4): 459-467*. [BA 2/88: 40].

CECCHI F. *et al.*, 1987. **Digestione anaerobica: aspetti chimici, ingegneristici e di processo.** *Acqua Aria, 9: 1075-1081*. [BA 3/88: 46].

KINNER N.E. *et al.*, 1987. **Development of protozoan and**

metazoan communities in rotating biological contactor biofilms. *Water Research, 21: 481-490*. [BA 3/88: 47].

WANNER J. *et al.*, 1987. **Control of activated sludge filamentous bulking - VII. Effect of anoxic conditions.** *Water Research, 21 (12): 1447-1451*. [BA 4/88: 60].

VALLINI G. *et al.*, 1987. **Metanogenesi: aspetti microbiologici e biochimici della degradazione anaerobica di substrati organici complessi.** *Acqua Aria, 8: 949-954*. [BA 4/88: 61].

EPINEY N., 1988. **Depurazione fisica e biologica delle acque reflue mediante "microsetacciamento" e "colture fissate". L' esempio della stazione di depurazione d' Aire (Ginevra).** *Amb. Risorse Salute, n. 79: 22-31*. [BA 2/89: 81].

BUTELLI P., 1988. **Impatto da aerosol batterici negli impianti di depurazione.** *Ing. Amb., 17, n. 1, gen. 88*. [BA 2/89: 82].

LAVOIE A. *et al.*, 1985. **Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus obliquus*. A new approach for waste water biological tertiary treatment?** *Water Research, 19, n. 11: 1437-1442*. [BA 2/89: 83].

HAHN H.H. *et al.*, 1989. **Aspetti ambientali delle fognature.** *Ing. Amb., 17 (3-4)*. [BA 5/89: 109].

DEBUSK T. *et al.*, 1989. **Performance of a pilot-scale water hyacinth-based secondary treatment system.** *Journal WPCF, 61 (7): 1217-1224*. [BA 1/90: 122].

PARRY J.L. *et al.*, 1988. **The temporal and spatial distribution of nematodes in percolating filters.** *Hydrobiologia, 160: 249-255*. [BA 1/90: 124].

SALVADO H. *et al.*, 1988. **Estudio de la poblacion de microorganismos en una planta depuradora urbana de fangos activados.** *P. Dept. Zool. Barcelona, 14: 21-29*. [BA 6/90: 160].

RIVERA F. *et al.*, 1988. **Protozoa of a rotating biological contactor treatment plant in Mexico.** *Water, Air and Soil Pollution, 42: 281-301*. [BA 6/90: 161].

JAIN S.K. *et al.*, 1990. ***Azolla pinnata* R. Br. and *Lemna minor* L. for removal of lead and zinc from polluted water.** *Water Research, 24: 177-183*. [BA 3-4/91: 199].

PERRONE S., 1989. **Lo smaltimento delle acque di vegetazione delle olive.** *Inquinamento, XXXI(6): 42-45*. [BA 2/91: 184].

CARDINALETTI M. *et al.*, 1990. **Dinamiche di popolazione della microfauna in un impianto di trattamento urbano-industriale a fanghi attivati.** *Inquinamento, 2: 62-68*. [BA 5/91: 206].

BALICE V. *et al.*, 1990. **Biodegradabilità e destino di microinquinanti organici negli impianti di trattamento delle acque. Aspetti generali e necessità di ricerca.** *Ing. Amb., 19: 41-68*. [BA 5/91: 207].

MUNAÒ F. *et al.*, 1990. **Influenza degli inibitori sui processi di nitrificazione negli impianti convenzionali di depurazione dei liquami.** *Acqua Aria, 9: 769-774*. [BA 2/92: 223].

ANDREOTTOLA G. *et al.*, 1990. **Tecniche avanzate di rimozione biologica di azoto e fosforo dalle acque di scarico.** *Ing. Amb., XIX (5): 287-300*. [BA 2/92: 224].

DENARO R., 1990. **Utilizzazione delle acque reflue in agricoltura ed acquacoltura. I e II parte.** *Ing. Amb., XIX (5): 330-338 e (7/8): 502-511*. [BA 2/92: 225].

PITT P. *et al.*, 1990. **Causes and control of *Nocardia* in activated sludge.** *Res. J. Water Pollut. Control Fed., 62: 143-150*. [BA 6/92: 244].

POLLARD S.J.T. *et al.*, 1992. **Low-cost adsorbents for waste and wastewater treatment: a review.** *The Sc. of the Total Environ., 116: 31-52*. [BA 5/93: 278].

DE FRAJA FRANGIPANE E. *et al.*, 1992. **Recenti tendenze negli impianti di depurazione di piccole dimensioni.** *IA-Ing. Amb., XXI (10): 565-576*. [BA 6/93: 281].

SIRACUSA G. *et al.*, 1992. **Progetto integrato chimico-fisico per la depurazione delle acque di vegetazione di frantoi oleari.** *Inquinamento, 7/8: 48-51*. [BA 6/93: 282].

CARLINI M., 1992. **Trattamento dei reflui: le acque di vegetazione dei frantoi oleari.** *suppl. a CEEP/Ambiente, 31: 1-8*. [BA 3-4/94: 313].

DE NARDO L. *et al.*, 1992. **Verifica del rendimento di depurazione di reflui urbani di 53 impianti comunali operanti nella provincia di Padova.** *Acqua Aria, 1: 23-30*. [BA 2/94: 300].

COOMBS R.M. *et al.*, 1991. **The use of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis to control the nuisance fly *Sylvicola fenestralis* (Anisopodidae) in sewage filter beds.** *Wat. Res., 25 (5): 605-611*. [BA 2/94: 301].

BONAZZI G., 1989. **Riduzione degli odori da liquami zootecnici mediante trattamento elettrolitico (oligolisi).** *L'Informatore Agrario, 29: 33*. [BA 2/94: 304].

MADONI P. *et al.*, 1993. **Comparative analysis of the activated sludge microfauna in several sewage treatment works.** *Water Research, 27, 1485-1491*. [BA 5/94: 320].

DRUSIANI R. *et al.*, 1993. **Scelta dello schema di trattamento in funzione della tipologia dello scarico. Trattamento finale e riuso delle acque.** *Ingegn. San.-Amb., mag.-giu.: 18-26*. [BA 5/94: 321].

NYBROE O. *et al.*, 1992. **Enzyme activities in waste water and activated sludge.** *Water Research, 26, 579-584*. [BA 5/94: 322].

FOOT R.J. *et al.*, 1992. **Variable morphology of *Microthrix parvicella* in activated sludge systems.** *Wat. Res., 26 (7): 875-880*. [BA 1/95: 326].

PUJOL R. *et al.*, 1991. **Biological foams in activated sludge plants: characterization and situation.** *Wat. Res., 25 (11): 1399-1404*. [BA 1/95: 327].

ETTALA M. *et al.*, 1992. **Removal of chlorophenols in a municipal sewage treatment plant using activated sludge.** *Wat. Res., 26 (6): 797-804*. [BA 1/95: 328].

CAVADORE A. *et al.*, 1993. **Acido Peracetico-Oxymaster: disinfezione acque reflue urbane di un depuratore cittadino. Esperienze industriali all'impianto di Cesena.** *Ingegn. sanitaria-ambientale, gen.-feb.: 23-27*. [BA 6/95: 348].

BRANDI G. *et al.*, 1993. **Dispersione nell'ambiente di aerosols microbici generati da impianti di depurazione a fanghi attivi .** *Ing. Amb., XXII (11/12)*. [BA 6/95: 349].

CASEY T.G. *et al.*, 1992. **A hypothesis for the cause of low F/M filament bulking in nutrient removal activated sludge system.** *Wat. Res., 26 (6): 867-869*. [BA 6/95: 350].

MEZZANOTTE V. *et al.*, 1995. **Analisi di fosforo e boro in alcuni impianti di depurazione urbani. Apporto pro-capite, capacità di rimozione e concentrazione nei fanghi.** *Inquinamento, 7: 40-45*. [BA 6/95: 351].

Depurazione seminaturale

GERSBERG R.M. *et al.*, 1986. **Role of aquatic plants in wastewater treatment by artificial wetlands.** *Water Research, 20 (3): 363-368*. [BA 1/88: 33].

BELL J.P. *et al.*, 1987. **Removal of hazardous organic pollutant by biomass adsorption.** *J.W.P.C.F., 59 (4): 191*. [BA 2/88: 39].

BOWNER K.H., 1987. **Nutrient removal from effluents by an artificial wetland: influence of rhizosphere aeration and preferential flow studied using bromide and dye tracers.** *Water Research, 21 (5): 591-599*. [BA 4/88: 58].

ORON G. *et al.*, 1988. **Nitrogen removal and conversion by duckweed grown on waste-water.** *Water Research, 22 (2): 179-184*. [BA 4/88: 59].

VUILLOT M. *et al.*, 1987. **French experience in the operation and maintenance of wastewater treatment lagoons.** *Water Sc. Techn., 19 (12): 333-335*. [BA 6/92: 243].

DEBUSK T.A. *et al.*, 1987. **BOD removal in floating aquatic macrophyte-based wastewater treatment systems.** *Water Sc. Technol. 19 (12): 273-279*. [BA 2/93: 258].

COOPER P.F. *et al.*, 1990. **The use of reed bed treatment systems in the UK.** *Water Sc. Technol. 22 (3/4): 57-64*. [BA 2/93: 259].

SCHIERUP H.H. *et al.*, 1990. **Danish experience with emergent hydrophyte treatment systems (EHTS) and prospects in the light of future requirements on outlet water quality.** *Water Sc. Technol. 22 (3/4): 65-72*. [BA 2/93: 260].

MIDDLEBROOKS E.J., 1987. **Design equations for BOD removal in facultative ponds.** *Water Sc. Technol. 19 (12): 187-193*. [BA 2/93: 261].

CARRÈ J. *et al.*, 1987. **Effects of maturation on the characteristics of wastewater stabilization pond sludges.** *Water Sc. Technol. 19 (12): 169-175*. [BA 2/93: 262].

PEARSON H.W. *et al.*, 1987. **Factor determining algal populations in waste stabilization ponds and the influence of algae on pond performance.** *Water Sc. Technol. 19 (12): 131-140*. [BA 2/93: 263].

LANSDELL M., 1987. **The development of lagoons in Venezuela.** *Water Sc. Technol. 19 (12): 55-60*. [BA 2/93: 264].

OLESZKIEWICZ J.A. *et al.*, 1987. **Wastewater lagoons in a cold climate.** *Water Sc. Technol. 19 (12): 47-53*. [BA 2/93: 265].

NAREASIAH K.S. *et al.*, 1990. **Sludge accumulation in aerated facultative lagoons operating in colder climate.** *Water Sc. Technol. 22 (3/4): 77-82*. [BA 2/93: 266].

VUILLOT M. *et al.*, 1987. **Waste stabilization ponds in Europe: a state of the art review.** *Water Sc. Technol. 19 (12): 1-6*. [BA 2/93: 267].

BUCKSTEEG K., 1987. **German experience with sewage treatment ponds.** *Wat. Sci. Tech., 19 (12): 17-23*. [BA 5/93: 268].

BOUTIN P. *et al.*, 1987. **Waste stabilization ponds in France: an overall review.** *Wat. Sci. Tech., 19 (12): 25-31*. [BA 5/93: 269].

AL-SALEM S.S. *et al.*, 1987. **An initial evaluation of Al Sumbra waste stabilization ponds (Jordan).** *Wat. Sci. Tech., 19 (12): 33-37*. [BA 5/93: 270].

GOMEZ DE SOUSA J.M., 1987. **Wastewater stabilization lagoon design criteria for Portugal.** *Wat. Sci. Tech., 19 (12): 7-16*. [BA 5/93: 271].

MARA D.D. *et al.*, 1990. **The design and operation of waste stabilization ponds in tourist areas of mediterranean Europe.** *Wat. Sci. Tech., 22 (3/4): 73-76*. [BA 6/93: 280].

ROGERS K.H. *et al.*, 1991. **Nitrogen removal in experimental wetland treatment systems: evidence for the role of acquatic plants.** *Research Journal WPCF, Vol. 63, (7)*. [BA 3-4/94: 312].

TSIPRIJAN V.I. *et al.*, 1987. **Wastewater treatment in stabilization ponds with higher aquatic plants.** *Wat. Sci. Techn., 19 (12): 287-288*. [BA 2/94: 302].

ELLIS K.V. *et al.*, 1993. **Parasite ova and cysts in waste stabilization ponds.** *Water Research, 27, 1455-1460*. [BA 1/95: 329].

Destino ambientale

HOLYSH M. *et al.*, 1986. **Assessment of the environmental fate of linear alkylbenzene-sulphonates.** *Chemosphere, 15 (1): 3-20*. [BA 2/88: 42].

ROSS L.J. *et al.*, 1986. **Fate of thiobencarb and molinate in rice fields.** *J. Environ. Qual., 15 (3): 220-225*. [BA 2/88: 43].

WOOD L.W. *et al.*, 1987. **Sediment desorption of PCB congeners and their bio-uptake by dipteran larvae.** *Water Research, 21: 875-884*. [BA 2/88: 44].

NIMI A.J. *et al.*, 1986. **Biological half-lives of eight polycyclic**

aromatic hydrocarbons (PAHs) in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Water Research, 20 (4): 503-507*. [BA 2/88: 45].

KEEFER R.F. *et al.*, 1986. **Chemical composition of vegetables grown on an agricultural soil amended with sewage sludges.** *J. Environ. Qual., 15, n. 2: 146-152*. [BA 3/89: 85].

PETERSEN R.C. JR. *et al.*, 1985. **The octanol/water partition coefficient of humic material and its dependence on hydrogen ion activity.** *Vatten, 41: 236-239,*. [BA 3/89: 86].

MALCEVSCHI S. *et al.*, 1988. **Indici convenzionali di rischio ambientale: una proposta metodologica.** *Acqua-Aria, 5: 569-577*. [BA 3/89: 87].

CAMPANELLA L. *et al.*, 1989. **Adsorbimento di metalli pesanti sul terreno: influenza della composizione del terreno e dei parametri sperimentali.** *Acqua-Aria, 1: 29-34*. [BA 5/89: 110].

GALASSI S. *et al.*, 1987. **Circolazione ed effetti degli idrocarburi aromatici negli ambienti acquatici.** *Acqua-Aria, 5*. [BA 5/89: 111].

ROSAS I. *et al.*, 1984. **Cytogenetic effects of cadmium accumulation on water hyacinth (*Eichhornia crassipes*).** *Environ. Research, 33: 386-395*. [BA 3-4/91: 200].

MARENGO G. *et al.*, 1990. **Biodegradabilità dell'NTA in sistemi acquatici a diverso grado di trofia.** *Acqua Aria, 1: 35-40*. [BA 3-4/91: 201].

WARWICK FISHER S., 1990. **The pH dependent accumulation of PCP in aquatic microcosms with sediment.** *Aquatic Toxicology, 18: 9-218*. [BA 5/91: 204].

CHARRIÈRE B. *et al.*, 1991. **Nature and distribution of phenolic compounds in water and sediments from Mediterranean deltaic and lagunal environments.** *Hydrobiologia, 222: 89-100*. [BA 6/93: 285].

DI GUARDO A. *et al.*, 1993. **Agrifug: previsione della contaminazione di acque superficiali con un modello sequenziale di fugacità.** *Ing. Amb., 7/8*. [BA 6/95: 353].

Van Der Kooij L.A. *et al.*, 1991. **Deriving quality criteria for water and sediment from the results of aquatic toxicology tests and product standards: application of the equilibrium partitioning method.** *Water Research*, 6: 697-705. [BA 5/96: 369].

Baldi M. *et al.*, 1993. **Diffusione di erbicidi attraverso acque superficiali.** *Inquinamento*, 3: 68-72. [BA 5/96: 370].

Tremolada P. *et al.*, 1994 **Composti organoclorurati nella biomassa vegetale sull'arco alpino: effetto diluizione.** *Ingegneria Ambientale*, XIII: 6. [BA 5/96: 371].

Ecologia fluviale

STOUT R.J. *et al.*, 1985. **Patterns of macroinvertebrates colonization on fresh and senescent alder leaves in two Michigan streams.** *Freshwater Biology, 15: 573-580*. [BA 1/87: 3].

MALMQUIST B. *et al.*, 1984. **The microdistribution of some lotic insect predators in relation to their prey and to abiotic factors.** *Freshwater Biology, 14: 649-656*. [BA 1/87: 4].

MARTIN J.D., 1985. **Microhabitat selection and life cycle patterns of two *Rhyacophila* species (Trichoptera: Rhyacophilidae) in southern Ontario streams.** *Freshwater Biology, 15: 1-14*. [BA 1/87: 5].

BLOIS C., 1985. **The larval diet of three anisopteran (Odonata) species.** *Freshwater Biology, 15: 505-514*. [BA 1/87: 6].

HILDREN A.G. *et al.*, 1984. **Community structure in some southern English streams: the influence of species interactions.** *Freshwater Biology, 14: 297-310*. [BA 2/87: 15].

BRONMARK C. *et al.*, 1984. **Animal community structure as a function of stream size.** *Hydrobiologia, 112: 73-79*. [BA 2/87: 16].

IRVINE J.R., 1985. **Effects of successive flow perturbations on stream invertebrates.** *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 42: 1922-1927*. [BA 2/87: 17].

GHETTI P.F. *et al.*, 1984. **The drift over one year of Plecoptera and Ephemeroptera in a small stream in Northern Italy.** *Arch. Hydrobiol., 99 (4): 478-488*. [BA 3/87: 21].

CHADWICK J.W. *et al.*, 1986. **Recovery of benthic invertebrate communities in silver bow creek, Montana, following improved metal mine wastewater treatment.** *Water, Air, and Soil Pollution, 28: 427-438*. [BA 3/87: 22].

ROSSI L., 1985. **Interaction between invertebrates and microfungi in freshwater ecosystems.** *Oikos, 44: 175-184*. [BA 3/87: 23].

DUDLEY D.W., 1986. **Factors influencing the microdistribution of two sympatric species of Plecoptera: an experimental study.** *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 43*. [BA 1/88: 31].

ADAMS J. *et al.*, 1987. **Factors affecting the microdistribution of *Gammarus pulex* (Amphipoda): an experimental study.** *Freshwater Biology, 17: 307-316*. [BA 3/88: 55].

EMERSON J.W., 1971. **Channellization: a Case study.** *Sc., v. 173, july: 325-326*. [BA 1/89: 65].

BULL W.B. *et al.*, 1974. **Impact of mining gravel from urban stream beds in the Southwestern United States.** *Geology, april: 171-174*. [BA 1/89: 66].

GREGORY K.J., 1979. **Hydrogeomorphology: how applied should we become?** *Progress in Phys. Geogr., 3 (a): 84-101*. [BA 1/89: 67].

GREGORY K.J., 1982. **Fluvial geomorphology: less uncertainty and more practical application?** *Progress in Phys. Geogr., 6: 427-438*. [BA 1/89: 68].

FERNHOLZ W.B., 1979. **To determine the significance of wing dams, riprap and sand as fishery habitat.** *Mississippi River Wrk Unit Annual Report*. [BA 1/89: 69].

KELLER E.A., 1975. **Channellization: a search for a better way.** *Geology, may: 246-248*. [BA 1/89: 70].

MOSLEY M.P., 1986. **River channel inventory, habitat and instream flow assessment.** *Progress in Phys. Geogr., 10: 494-523*. [BA 1/89: 71].

BROOKES A., 1985. **River channellization: traditional engineering methods, physical consequences and alternative practices.** *Progress in Phys. Geogr., 9 (a): 44-73*. [BA 1/89: 72].

DRAKE J.A., 1984. **Species aggregation: the influence of detritus in a benthic invertebrate community** *Hydrobiologia, 112: 109-115*. [BA 2/89: 73].

LENA B.-M. PETERSEN. *et al.*, 1983. **Anomalies in hydropsychid capture nets from polluted streams.** *Freshwater Biology, 13: 185-191*. [BA 2/89: 74].

LENA B.-M. PETERSEN. *et al.*, 1984. **Effects of kraft pulp mill effluent and 4,5,6, trichloroguaiacol on the net spinning behavior of *Hydropsyche angustipennis* (Trichoptera).** *Ecological Bulletin, 36: 68-74*. [BA 2/89: 75].

LENA B.-M. PETERSEN. *et al.*, 1987. **Environmental factors affecting the net-spinning behavior of *Hydropsyche angustipennis* and *H. saxonica* (Hydropsychidae: Trichoptera).** *Dept. of Ecol. and Limnol., Univ. of Lund, Sweden*. [BA 2/89: 76].

DENISEGER J. *et al.*, 1986. **Periphyton communities in a pristine muontain stream above and below heavy metal mining operations.** *Freshwater Biology, 16: 209-218*. [BA 2/89: 80].

NEWBOLD J.D. *et al.*, 1981. **Measuring nutrient spiralling in Streams.** *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 38: 860-863*. [BA 3/89: 92].

MINSHALL G.W. *et al.*, 1983. **Interbiome comparison of stream ecosystem dynamics.** *Ecological Monographs, 53 (1): 1-25*. [BA 3/89: 93].

CROSA G. *et al.*, 1988. **Determinazione delle portate minime necessarie per la tutela della vita acquatica in corsi d' acqua soggetti a derivazioni o ritenute.** *Acqua-Aria, 7: 839-850*. [BA 4/89: 101].

BOURNAUD M. *et al.*, 1986. **Les microhabitats aquatiques des rives d' un grand cours d' eau: approche faunistique.** *Annls Limnol., 22 (3): 285-294*. [BA 1/90: 115].

OUTRIDGE P.M., 1987. **Possible cause of high species diversity in tropical Australian freshwater macrobenthic communities.** *Hydrobiologia, 150: 95-107*. [BA 1/90: 116].

SÖDERSTRÖM O., 1987. **Upstream movements of invertebrates in running waters. A review.** *Arch. Hydrobiol., 111 (2): 197-208*. [BA 1/90: 117].

MINSHALL G.W. *et al.*, 1985. **Species richness in streams of different size from the same drainage basin.** *The Am. Naturalist, 125 (1): 16-38*. [BA 1/90: 118].

CUMMINS K.W. *et al.*, 1981. **Trends in particulate organic matter fluxes, community processes and macroinvertebrates functional groups along a Great Drainage Basin river continuum.** *Verh. Internat. Verein. Limnol., 21: 841-849*. [BA 5/90: 147].

VANNOTE R.C. *et al.*, 1982. **Fluvial processes and local lithology controlling abundance, structure and composition of mussel beds.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 4103-4107*. [BA 5/90: 148].

ALLAN J.D. *et al.*, 1985. **The quantification of stream drift.** *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 42: 210-215*. [BA 5/90: 149].

WILLOUGHBY L.G. *et al.*, 1988. **The distribution of *Ephemerella ignita* in streams: the role of pH and food resources.** *Freshwater Biology, 19: 145-155*. [BA 5/90: 150].

VANNOTE R.L., 1978. **A geometric model describing a quasi-equilibrium of energy flow in populations of stream insects.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 (1): 381-384*. [BA 5/90: 151].

GARDEN A. *et al.*, 1988. **Decay rates of autumn and springs leaf litter in a stream and effects on growth of a detritivore.** *Freshwater Biology, 19: 297-303*. [BA 5/90: 156].

FORTUNÈ M., 1988. **Historical changes of a large river in an urban area: the Garonne River, Toulouse, France.** *Regulated Rivers: Res. and Manag, vol. 2: 179-186*. [BA 6/90: 165].

HOLMES N. *et al.*, 1984. **River plant communities. Reflectors of water and substrate chemistry.** *Nature Conservancy Council (n. 9): 73 pp*. [BA 3-4/91: 196].

DUMNICKA E. *et al.*, 1988. **Effects of regulated stream on the hydrochemistry and zoobenthos in differently polluted parts of the upper Vistola River (Southern Poland).** *Hydrobiologia, 169: 183-191*. [BA 3-4/91: 190].

HILL A.R., 1988. **Factors influencing nitrate depletion in a rural stream.** *Hydrobiologia, 160: 111-122*. [BA 1/91: 177].

CUMMINS K.W., 1973. **Trophic relations of aquatic insects.** *Repr. from Annual Review of entomol., 18: 183-206*. [BA 1/91: 175].

UZUNOV Y. *et al.*, 1987. **The macrozoobenthos of Struma River. An example of a recovered community after the elimination of a heavy industrial impact with suspended materials.** *Arch. Hydrobiol., suppl. 76 (1-2): 169-196*. [BA 1/91: 176].

DECAMPS H. *et al.*, 1988. **Historical influence of man on the riparian dynamics of a fluvial landscape.** *Landscape Ecology, 1 (3): 163-173*. [BA 2/91: 187].

WEATHERLEY N.S. *et al.*, 1990. **Forests and the temperature of upland streams in Wales: a modelling exploration of the biological effects.** *Freshwater Biology, 24: 109-122*. [BA 5/91: 208].

LEFF L.G. *et al.*, 1989. **The effect of leaf peck composition on processing: a comparison of mixed and single species packs.** *Hydrobiologia, 142: 219-224*. [BA 3-4/92: 235].

ARMITAGE M.J. *et al.*, 1990. **The realized food niches of three species of stream-dwelling Triclads (Turbellaria).** *Freshwa-*

ter Biology, 24: 93-100. [BA 6/92: 238].

COURTEMANCH D.L. *et al.*, 1987. **A coefficient of community loss to assess detrimental change in aquatic communities.** *Water Research, 21 (2): 217-222*. [BA 6/92: 239].

REYNOLDSON T.B. *et al.*, 1989. **The biological assessment of contaminated sediments. The Detroit river example.** *Hydrobiologia, 188/189: 463-476*. [BA 6/92: 240].

BROWN A.W. *et al.*, 1991. **Comparison of bentic invertebrates between riffles and pools.** *Hydrobiologia, 220: 99-108*. [BA 6/92: 241].

CRUNKILTON R.L. *et al.*, 1991. **Use of stream order and biological indices to assess water quality in the Osage and Black River basin of Missouri.** *Hydrobiologia, 224: 155-166*. [BA 6/92: 242].

PRINGLE C.M. *et al.*, 1991. **Effects of geotermical groundwater on nutrient dynamics of a lowland Costa Rican stream**. *Ecology, 72 (3): 951-965*. [BA 5/93: 276].

TRISKA F.J. *et al.*, 1990. **In situ retention-transport response to nitrate loading and storm discharge in a third order stream.** *J. of the North Am. Benthol. Soc., 9 (3): 229-239*. [BA 5/93: 277].

S.I.G.E.A., 1992. **La cementificazione dei fiumi e i suoi effetti ambientali.** *IA-Ingegn. Amb., XXI (10): 590-591*. [BA 6/93: 286].

CROONQUIST M. J. *et al.*, 1993. **Effects of habitat disturbance on birds communities in riparian corridors.** *J. Soil and Water Conserv., 48 (1): 65-70*. [BA 2/95: 345].

VITALI R., 1993. **Diversificazione degli habitat fluviali e perifluviali.** *Acqua-Aria (7): 731-733*. [BA 6/95: 355].

VANNOTE R.L. *et al.*, 1980. **The River Continuum Concept .** *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 37: 130-137*. [BA 4/96: 359].

STATZNER B. *et al.*, 1985. **Question and comments on the River Continuum Concept.** *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 42: 1038-1044*. [BA 4/96: 360].

BILBY R.E. *et al.*, 1980. **Importance of organic debris dams in the structure and function of stream ecosystems.** *Ecology, 61 (5): 1107-1113*. [BA 4/96: 361].

MINSHALL G.W. *et al.*, 1985. **Developments in stream ecosystem theory.** *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 42: 1045-1055*. [BA 4/96: 362].

PETERSEN R.C. *et al.*, 1987. **Stream management: emerging global similarities.** *Ambio, 16 (4): 166-179*. [BA 4/96: 363].

HOBBS R.J. *et al.*, 1990. **Nature conservation: the role of corridors.** *Ambio, 19 (2): 94-95*. [BA 4/96: 364].

PENNAK R.W., 1971. **Toward a classification of lotic habitats.** *Hydrobiologia, 38 (2): 321-334*. [BA 4/96: 365].

Karr J.R. *et al.*, 1978. **Water resources and the land-water interface.** *Science*, 201: 229-234. [BA 5/96: 366].

Lamberti G.A. *et al.*, 1991. **Stream ecosystem recovery following a catastrophic debris flow.** *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 196-208. [BA 5/96: 367].

Dudgeon D., 1991. **An experimental study of abiotic disturbance effects on community structure and function in a tropical stream.** *Arch. Hydrobiol*., 122 (4): 403-420. [BA 5/96: 368].

Ecologia generale

MOUCHET P., 1986. **Revue des réactions des algues aux micropolluants mineraux et organiques; conseguences ecologiques et possibilités d'applications industrielles.** *Water Research, 20 (4): 399-412*. [BA 3/87: 25].

HERRMANN J., 1985. **Temperature dependance of reproduction in *Dendrocoelum lacteum* (Turbellaria): an experimental approach.** *Oikos, 44: 268-272*. [BA 3/87: 24].

AMORI G. *et al.*, 1987. **Elementi di valutazione ambientale di tre siti nell'Italia centrale (Lazio) tramite l'analisi di rigetti di *Tyto alba* (Scopoli, 1769).** *Acqua Aria, 9: 1085-1089*. [BA 3/88: 48].

WROOT A.J., 1985. **A quantitative method for estimating the amount of earthworm (*Lumbricus terrestris*) in animal diets.** *Oikos, 44: 239-242*. [BA 3/88: 49].

CROSETTI D. *et al.*, 1987. **Distribution and life cycles of cladocerans in temporary pools from Central Italy.** *Freshwater Biology, 18: 165-175*. [BA 3/88: 53].

KORPELAINEN H., 1986. **The effects of temperature and photoperiod on life history parameters of *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera).** *Freshwater Biology, 16: 615-620*. [BA 3/88: 54].

FRIDAY L.E., 1987. **The diversity of macroinvertebrate and macrophyte communities in ponds.** *Freshwater Biology, 18: 87-104*. [BA 4/88: 56].

PETERSEN R.C. JR. *et al.*, 1987. **The Biological Importance of Humic Material in Acidified Waters.** *Nat. Swedish Environ. Prot. Board Rep. 3388,*. [BA 3/89: 89].

SWEERTS J.P. *et al.*, 1986. **Metabolic activities in flocculent surface sediments and underlying sandy littoral sediments.** *Limnol. Oceanogr., 31 (2): 330-338*. [BA 3/89: 90].

ARATA P. *et al.*, 1989. **Importanza delle praterie di *Posidonia oceanica* nel sistema marino costiero e degli interventi per la loro salvaguardia.** *Acqua-Aria, 5: 555-571*. [BA 4/89: 103].

MCCLAUGHERTY *et al.*, 1985. **Forest litter decomposition in relation to soil nitrogen dynamics and litter quality.** *Ecology, 66 (1): 266-275*. [BA 5/89: 112].

ZOPPINI A. *et al.*, 1988. **Misure di ATP cellulare per la stima delle biomasse di microrganismi acquatici.** *Inquinamento, 10: 60-63*. [BA 5/89: 113].

RUFFO S. *et al.*, 1988. **Contributo alla conoscenza della distribuzione degli Anfipodi nel Veneto orientale.** *Riv. Idrobiol., 27 (2-3): 431-448*. [BA 3-4/91: 189].

ISMAIL N.S., 1986. **Community structure of macrobenthic invertebrates in sandy beaches of the Jordan Gulf of Aqaba, Red Sea.** *Int. Rev. ges. Hydrobiol., 71 (2): 225-232*. [BA 1/91: 174].

SCHINDLER D.W., 1988. **Confusion over the origin of alkalinity in lakes.** *Limnol. Oceanogr., 33 (6 part 2): 1637-1640*. [BA 2/91: 183].

THRELKELD S. T., 1988. **Planktivory and planktivore biomass effects on zooplancton, phytoplancton, and the trophic cascade.** *Lymnol. Oceanogr., 33(6, part 1): 1362-1375*. [BA 2/91: 185].

LAMI A. *et al.*, 1981. **I batteri fotosintetici sulfurei e loro importanza nello studio dell'evoluzione trofica di ambienti lacustri.** *Acqua Aria, 9: 845-851*. [BA 3-4/92: 234].

MANTOVANI A. *et al.*, 1992. **Animals as host of zoonoses.** *Ann. Ist. Sup. San., 28 (4): 465-471*. [BA 1/95: 333].

MCCORMICK P.V. *et al.*, 1991. **Limited versus unlimited membership in microbial communities: evaluation and experimental tests of same paradigms.** *Hydrobiologia, 218: 77-91*. [BA 6/95: 358].

Gestione ambientale

SMITH M.S. *et al.*, 1985. **Transport of *Escherichia coli* through intact and disturbed soil columns.** *J. Environ. Qual., 14: 87-91*. [BA 2/87: 11].

BAZZANTI M. *et al.*, 1985. **Seasonal changes of the profundal macrobenthic community in a polluted lake.** *Schweiz. Z. Hydrol., 47 (1): 57-63*. [BA 2/87: 18].

OLORI L. *et al.*, 1988. **La caratterizzazione delle acque di scarico: una strategia su standard di qualità .** *Acqua-Aria, 8: 967-979*. [BA 4/89: 100].

SILVA S. *et al.*, 1987. **Effetti dell' uso in agricoltura dei fanghi di depurazione conciari.** *Ing. Amb., 16 (6): 312-318*. [BA 4/89: 102].

IUCULANO T., 1989. **Parco Nazionale di Plitvice: da una gestione integrata ad una gestione globale.** *Acer, 5: 29-32*. [BA 6/90: 166].

LABROUE L. *et al.*, 1986. **Épuration naturelle des nitrates des eaux souterraines: possibilitées d'application au reaménagement de lacs de gravieres.** *Annls Limnol., 22(1): 83-88*. [BA 6/90: 167].

REG. EMILIA ROMAGNA, 1991. **Influenza degli apporti costieri sulle acque di balneazione.** *Reg. Em.-Romagna, Ass. Amb., pp. 166*. [BA 3-4/91: 193].

VITOUSEK P.M. *et al.*, 1979. **Nitrate losses from disturbed ecosystems.** *Sc., 204: 469-474*. [BA 3-4/91: 198].

COMIN F.A. *et al.*, 1990. **Proposals for macrophyte restoration in eutrophic coastal lagoons.** *Hydrobiologia, 200/201: 427-436*. [BA 1/93: 249].

HENDRIX W.G. *et al.*, 1992. **Use of a geographic information system for selection of sites for land application of sewage waste.** *J. of Soil and Water Conserv., 47: 271-275*. [BA 2/95: 344].

PAGNOTTA R., 1993. **Criteri per la classificazione delle acque superficiali ai fini della determinazione delle aree sensibili.** *Ing. Sanit.-Amb., (mag.-giu.): 11-17*. [BA 6/95: 354].

Igiene ambientale

LEWIS G.D. *et al.*, 1986. **Enterovirus removal from sewage. The effectiveness of four different treatment plants.** *Water Research, 20 (10): 1291-1297*. [BA 2/87: 12].

SARTORY D.P., 1986. **Membrane filtration enumeration of faecal clostridia and *Clostridium perfringens* in water.** *Water Research, 20 (10): 1255-1260*. [BA 2/87: 13].

NURIZZO C. *et al.*, 1988. **Denitrificazione biologica di acque ad uso potabile. Risultati della prima serie di prove sperimentali.** *Ing. Amb., 17, n. 2, feb*. [BA 3/89: 88].

VOLTERRA L. *et al.*, 1988. **Pesci come vettori di microrganismi: rassegna bibliografica.** *L'Igiene Moderna, 90: 782-795*. [BA 5/90: 153].

MCCOY W.C. *et al.*, 1986. **Relationship among turbidity, particle counts and bacteriological quality water distribution lines.** *Water Research, 20 (8): 1023-1029*. [BA 5/90: 154].

HAAS C.N. *et al.*, 1986. **Statistics of enumerating total coliforms in water samples by membrane filter procedures.** *Water Research, 20 (4): 525-530*. [BA 5/90: 155].

BELLINI R. *et al.*, 1989. **Lotta biologica con parassitoidi contro le mosche degli allevamenti zootecnici.** *L'Informatore Agrario, 33: 87-89*. [BA 6/90: 162].

SALIS A. *et al.*, 1990. **Studio su alcuni insetticidi antilarvali per l'ambiente del canale di Terramaini.** *Acqua Aria, 3: 241-247*. [BA 2/91: 182].

GALASSI S. *et al.*, 1990. **Erbicidi e esteri fosforici in acque di superficie e di falda destinate al consumo umano.** *Acqua - Aria, 3: 231-240*. [BA 2/91: 188].

AULICINO F.A. *et al.*, 1991. **Studio di un caso di corrosione batterica in un acquedotto di una regione italiana.** *Rapporto ISTISAN n. 91/4, 91 pp*. [BA 6/91: 216].

CASSON L.W. *et al.*, 1990. ***Giardia* in wastewater. Effect of treatment.** *J. Water Pollut. Control Fed., 62: 670-675*. [BA 3-4/92: 230].

BRIGANTI V., 1991. **L'impiego dell'acqua ossigenata per la**

rimozione dei composti organici alogenati nei trattamenti di potabilizzazione delle acque. *Biologi Italiani, 9: 13-15*. [BA 2/92: 219].

Bernagozzi M. *et al.*, 1990. **Caratteristiche microbiologiche di acque destinate ad uso potabile sottoposte a trattamento con apparecchi a resine scambiatrici di ioni.** *Igiene Moderna, 93: 891-901*. [BA 2/92: 220].

Bucci R. *et al.*, 1991. **Utilizzazione di filtri a carbone attivo nel trattamento di potabilizzazione delle acque: significato della crescita di schizomiceti sulla superficie dei letti e rischi correlati.** *Igiene Moderna, 95: 589-604*. [BA 2/92: 221].

Albertin P. *et al.*, 1990. **La predisinfezione nei trattamenti di potabilizzazione.** *Inquinamento, XXXII (9): 68-75*. [BA 2/92: 222].

Martins M.T. *et al.*, 1991. **Comparison of the presence-absence (P-A) test and conventional methods for detection of bacteriological water quality indicators.** *Wat. Res., 25 (10): 1279-1283*. [BA 6/93: 283].

Cornax R. *et al.*, 1991. **Significance of several bacteriophage groups as indicators of sewage pollution in marine waters.** *Wat. Res., 25 (6): 673-678*. [BA 6/93: 284].

Tonelli E. *et al.*, 1992. **Modificazioni microbiologiche e chimiche di acque potabili sottoposte ad addolcimento con un apparecchio di terza generazione.** *L'Igiene Moderna, 98: 673-687*. [BA 3-4/94: 305].

Leclerc H., 1993. **Le acque minerali naturali: microbiologia e normativa.** *Riv. Sc. Alimentaz., 22 (2): 219-239*. [BA 3-4/94: 306].

Vazzoler M. *et al.*, 1991. **Indici microbiologici nei contenitori per rifiuti solidi urbani (R.S.U.).** *L'Igiene Moderna, 95: 304-310*. [BA 3-4/94: 307].

Volterra L. *et al.*, 1992. **La conta batterica totale in acque salate.** *Ing. Amb., XXI (3-4): 168-174*. [BA 3-4/94: 308].

Scassellati Sforzolini G. *et al.*, 1992. **Acqua destinata ad uso potabile e salute: valutazione dei rischi mutageno-cancerogeni per l' uomo.** *L'Igiene Moderna, 97 (5): 884-898*. [BA 1/94: 287].

IAWPCR, 1991. **Bacteriophages as model viruses in water quality control** *IAWPRC Wat. Res. Vol. 25, N° 5, pp. 529-545, 91*. [BA 1/94: 288].

Reali D. *et al.*, 1991. **Riflessioni sull'uso dei batteriofagi come indici di contaminazione fecale.** *L'Igiene Moderna, 95: 820-834*. [BA 1/94: 289].

De Mattia M. *et al.*, 1991. **Sulla possibile causa dei caratteri organolettici di un'acqua potabile.** *IA - Ingegn. Amb., XX (11-12): 675-677*. [BA 2/94: 296].

Del Vecchio G., 1992. **Studi moderni sul potere "autodepurativo" del mare e sul destino dei batteri -specialmente gli enterici- in esso riversati.** *Igiene e San. Pubbl., nov.-dic. '92*. [BA 2/94: 297].

Legnani P. *et al.*, 1991. **La qualità igienica delle acque minerali naturali: una responsabilità nei confronti del consumatore.** *Riv. Sc. Alimentaz., 22 (3): 293-301*. [BA 2/94: 298].

Volterra L. *et al.*, 1993 . **Nematodi nelle acque con particolare riguardo a quelle potabili.** *Ing. Amb. n.3-4: 200-202*. [BA 2/94: 299].

Giovenco A. *et al.*, 1992. **Formazione di clorofenoli nei processi di potabilizzazione delle acque.** *Inquinamento, XXXIV (5): 72-76*. [BA 5/94: 316].

Merlo G. *et al.*, 1993. **I sottoprodotti della disinfezione nella potabilizzazione delle acque superficiali: sviluppo di un modello previsionale.** *IA - Ing. Amb., XII (10): 543-549*. [BA 5/94: 317].

Specchiarello M. *et al.*, 1992. **L'impiego dei perossidi nei trattamenti di potabilizzazione delle acque superficiali.** *IA - Ing. Amb.,* ***XXI*** *(1): 38-42*. [BA 5/94: 318].

Baldry M.G.C. *et al.*, 1991. **The activity of peracetic acid on sewage indicator bacteria and viruses.** *Wat. Sci. Tech., 24 (2): 353-357*. [BA 2/95: 337].

Morris. R., 1993. **Reduction of microbial levels in sewage effluents using chlorine and peracetic acid disinfectants.** *Wat. Sci. Tech., 27 (3-4): 387-393*. [BA 2/95: 338].

Calamo-Specchia F.P. *et al.*, 1993. **Studio della contaminazione microbiologica negli impianti di emodialisi: primi risultati di una ricerca, valutazioni e prospettive di intervento.** *L'Igiene Moderna, 100: 943-962*. [BA 2/95: 339].

Contu A. *et al.*, 1993. **La qualità dell'acqua potabile in un periodo di emergenza idrica: valutazione dei principali inconvenienti igienici.** *L'Igiene Moderna, 99: 694-705*. [BA 6/95: 356].

Navazio G. *et al.*, 1993. **Impiantistica e sistemi di trattamento per la sicurezza igienica della risorsa acqua.** *IA - Ingegn. Amb., XXII (6): 320-326*. [BA 6/95: 357].

Mesofauna Suolo

Holliday N.J. *et al.*, 1982. **Soil fauna of a pest-management apple orchard.** *Rev. Ecol. Biol. Sol., 19 (1): 41-59*. [BA 3-4/90: 136].

Gers C., 1982. **Incidence de la simplification du travail du sol sur la microfaune édaphique hivernale: données préliminaires.** *Rev. Ecol. Biol Sol, 19 (4): 593-604*. [BA 3-4/90: 137].

Gray M.E. *et al.*, 1983. **Effects of an insecticide and herbicide combination on nontarget arthropods in a cornfield** *Environ. Entomol., 12: 1171-1174*. [BA 3-4/90: 138].

Massot C. *et al.*, 1986. **Étude, par l'analyse en composantes principales, de la mésofaune de la litière sous hêtre de quatre parcelles forestières exploitées différemment.** *Rev. Ecol. Biol Sol, 23 (1): 19-27*. [BA 3-4/90: 139].

ARPIN P. *et al.*, 1984. **Utilisation des nématodes Mononchida et des Collemboles pour caractériser des phénomènes pédobiologique.** *Rev. Ecol. Biol. Sol, 21 (2): 243-268*. [BA 3-4/90: 140].

POZO J. *et al.*, 1986. **Studies on the collembolan populations of several plant communities of the Basque Country (Spain).** *Rev. Ecol. Biol. Sol, 23: 215-232*. [BA 3-4/90: 141].

POZO J., 1986. **Ecological factors affecting collembola populations. Ordination of communities.** *Rev. Ecol. Biol. Sol, 23 (3): 299-311*. [BA 3-4/90: 142].

PAOLETTI M.G. *et al.*, 1988. **Pedofauna bioindicators and heavy metals in five agroecosystems in the north-east Italy.** *Rev. Ecol. Biol. Sol, 25 (1): 33-58*. [BA 3-4/90: 143].

BENGTSSON G. *et al.*, 1989. **Critical metal concentrations for forest soil invertebrates. A review of the limitations.** *Water, Air and Soil Pollution, 47: 381-417*. [BA 3-4/90: 144].

Metodi

BOWLES N.D. *et al.*, 1985. **Effective solvents and extraction periods employed in phytoplankton carotenoid and chlorophyll determinations.** *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 42: 1127-1131*. [BA 1/87: 9].

SARTORY D.P., 1985. **The determination of algal chlorophyllous pigments by High Performance Liquid Chromatography and spectrophotometry.** *Water Research, 19 (5): 605-610*. [BA 1/87: 10].

WARBINGTON R. C. *et al.*, 1987. **A membrane filter method for the enumeration of aquatic ammonifiers.** *Water Res., 21(5): 601-604*. [BA 3/89: 91].

FOWLER B. *et al.*, 1987. **An inexpensive water circulation system for studies of chemical exchange using intact sediments cores.** *Freshwater Biology, 17: 509-511*. [BA 4/89: 95].

MANCA M. *et al.*, 1988. **Apparecchiatura elettronica per la realizzazione di catene alimentari artificiali a due o più stadi con rifornimento costante di alimento.** *Acqua-Aria, n° 4/88*. [BA 4/89: 96].

DOUGLAS D.J. *et al.*, 1987. **A simple laboratory method for Benthal Oxygen Demand.** *Annls Limnol., 23 (3): 263-267*. [BA 4/89: 97].

OUDOT C. *et al.*, 1988. **Precise shipboard determination of dissolved oxygen (Winkler procedure) for productivity studies with a commercial system.** *Limnol. Oceanogr., 33 (1): 146-150*. [BA 5/90: 152].

TARTONI P.L. *et al.*, 1988. **La cluster analysis nel monitoraggio della qualità delle acque potabili.** *Tecnica Sanitaria, XXVI: 67-76*. [BA 6/90: 163].

MANNY B. *et al.*, 1989. **Field test for bioassay procedure for assessing habitat quality on fish spawning grounds.** *Trans. Amer. Fish. Soc., 118: 175-182*. [BA 3-4/92: 231].

GALGANI F. *et al.*, 1991. **Semi-automated colorimetric and enzymatic assay for aquatic organisms using microplate readers.** *Wat. Res., 25 (2): 147-150*. [BA 3-4/94: 314].

BILLINGTON N., 1991. **A comparison of three methods of measuring phytoplankton biomass on a daily and seasonal basis.** *Hydrobiologia, 226: 1-15*. [BA 1/95: 336].

Tossicologia

BLANCK H., 1985. **A simple, community level, ecotoxicological test system using samples of periphyton.** *Hydrobiologia, 124: 251-261*. [BA 1/87: 1].

GREENE J.C. *et al.*, 1985. **A comparison of three microbial assay procedures for measuring toxicity of chemical residues.** *Arch. Environ. Contam. Toxicol., 14: 659-667*. [BA 3/87: 26].

GERSIH F.M. *et al.*, 1986. **Technical note - Acute toxicity tests with *Daphnia magna* Straus and *Pimephales promelas* Rafinesque in support of national pollutant discharge elimination permit requirements.** *Water Research, 20 (7): 939-941*. [BA 3/87: 27].

KENAGA E.E., 1978. **Test organisms and methods useful for early assessment of acute toxicity of chemicals.** *Environ. Sci. & Technol., 12 (12): 1322-1329*. [BA 3/87: 28].

TURBAK S.C. *et al.*, 1986. **Comparison of algal assay systems for detecting waterborne herbicides and metals** *Water Research, 20 (1): 91-96*. [BA 3/87: 29].

VIGANÒ L., 1987. **Metalli e non metalli tossici totali: esame del limite della legge 319/76 con *Daphnia magna*.** *Ing. Amb., 16 (6): 341-345*. [BA 1/88: 35].

GRACE A.L. *et al.*, 1987. **The effects of copper on the heart rate and filtration rate of *Mytilus edulis*.** *Marine Pollution Bull., 18 (2): 87-91*. [BA 1/88: 36].

THOMAS J.M. *et al.*, 1986. **Characterization of chemical waste site contamination and determination of its extent using bioassays.** *Environ. Toxicol. and Chem., 5: 487-501*. [BA 3/88: 50].

RASCHKE R.L. *et al.*, 1987. **The use of the algal growth potential test for data assessment.** *J.W.P.C.F., 59 (4): 222-227*. [BA 3/88: 51].

SHERMAN E.R. *et al.*, 1987. **A comparison of toxicity tests conducted in the laboratory and in experimental ponds using cadmium and the fathead minnow (*Pimephales promelas*).** *Water Research, 3: 317-323*. [BA 3/88: 52].

DEVILLERS J. *et al.*, 1987. **A predictive structure-toxicity model with *Daphnia magna*.** *Chemosphere, 16 (6): 1149-1163*. [BA 4/88: 62].

NYBERG H., 1988. **Growth of *Selenastrum capricornutum* in**

the presence of synthetic surfactants. *Water Research, 22 (2): 217-223*. [BA 4/88: 63].

CARLINE R.F. *et al.*, 1987. **Long-term effects of treated domestic wastewater on brown trout.** *Water Research, 21 (11): 1409-1415*. [BA 4/88: 64].

COWGILL U.M. *et al.*, 1986. **The influence of water on reproductive success and chemical composition of laboratory reared populations of *Daphnia magna*.** *Water Research, 20, n. 5: 579-582*. [BA 2/89: 77].

HARGEBY A. *et al.*, 1988. **Effects of low pH and humus on the survivorship, growth and feeding of *Gammarus pulex* (L.) (Amphipoda).** *Freshwater Biology, 19: 235-247,*. [BA 2/89: 78].

DOJIMI DI DELUPIS G. *et al.*, 1989. **Effetti del dimetilsulfossido (DMSO) su alcune specie di macroinvertebrati acquatici.** *Acqua-Aria, 1: 35-37*. [BA 4/89: 98].

PETERSEN R.C. JR. *et al.*, 1987. **Comparison of the biological effects of Humic materials under acidified conditions.** *The Sc. of the Total Environ., 62: 387-398,*. [BA 4/89: 99].

GUZZELLA L. *et al.*, 1989. **Potenziale mutageno dei microinquinanti organici in acque superficiali e potabili dell' Italia settentrionale.** *Acqua-Aria, 2: 169-175*. [BA 5/89: 106].

GORAN MILBRINK, 1987. **Biological characterization of sediments by standardized tubificid bioassays.** *Hydrobiologia, 155: 267-275*. [BA 5/89: 107].

VIGANÒ L., 1986. **Test di tossicità su effluenti di scarico con trota e dafnia: confronto dei risultati.** *Acqua-Aria, 4, 409-413*. [BA 5/89: 108].

VIGANÒ L., 1989. **Test di tossicità con *Daphnia magna*: esame dei fattori che determinano l'idoneità dell'allevamento.** *Inquinamento, XXXI (9): 69-74*. [BA 1/91: 170].

GERSICH F.M. *et al.*, 1989. **Chronic toxicity of biphenyl to *Daphnia magna* Straus.** *Bull. Environ. Contam. Toxicol., 43: 355-362*. [BA 1/91: 171].

COWGILL U.M. *et al.*, 1989. **New approach to the seven-day *Ceriodaphnia dubia* test with additional comments pertaining to the same test for *Daphnia magna*.** *Bull. Environ. Contam. Toxicol., 42: 749-753*. [BA 1/91: 172].

WUNCHENG WANG, 1990. **Characterization of phytotoxicity of metal engraving effluent samples.** *Envir. Monit. and Ass., 14: 59-69*. [BA 1/91: 173].

ANTON F. *et al.*, 1990. **Acute toxicity of the fungicide captan to the earthworm *Eisenia foetida* (Savigny).** *Bull. Environ. Contam. Toxicol., 45: 82-87*. [BA 2/91: 178].

WANG W. *et al.*, 1989. **Determination and reduction od phytotoxicity of two industrial waste effluents.** *Water, Air and Soil Pollution, 44: 363-373*. [BA 2/91: 179].

WANG W. *et al.*, 1990. **The use of phytotoxicity tests (Common Duckweed, Cabbage, and Millet) for determining effluent toxicity.** *Env. Monit. and Ass., 14: 45-58*. [BA 2/91: 180].

VIGANÒ L., 1990. **Tossicità cronica di effluenti di scarico su *Daphnia magna*: ricerca della diluizione di non effetto.** *Acqua-Aria, 2: 145-148*. [BA 2/91: 181].

BIRKHOLZ D.A. *et al.*, 1990. **Aquatic toxicology of alkil-quinolines.** *Water Research, 24: 67-73*. [BA 5/91: 202].

VERSTEEG D.J. *et al.*, 1990. **A laboratory-scale model for evaluating effluent toxicity in activated sludge wastewater treatment plants.** *Water Research, 24:717-723*. [BA 5/91: 203].

LIPPINCOTT R.L. *et al.*, 1990. **Continuous liquid-liquid extractin for the preparation of chlorinated water samples for the Ames bioassay.** *Water Research, 24: 709-716*. [BA 5/91: 205].

BAIRD D.J. *et al.*, 1989. **The *Daphnia* bioassay: a critique.** *Hydrobiologia, 188/189: 403-406*. [BA 6/91: 210].

BUTTINO I. *et al.*, 1991. **Tossicità dei composti fenolici nell'ambiente marino.** *Acqua Aria, 9: 853-861*. [BA 6/91: 218].

TYLER G.A. *et al.*, 1989. **Heavy-metal ecology of terrestrial plants, microorganisms and invertebrates.** *Water, Air, and Soil Pollution, 47: 189-215*. [BA 3-4/92: 232].

BLUM D.J.W. *et al.*, 1991. **A database of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparisons and correlations.** *J. Water Pollut. Control Fed., 63: 8-207*. [BA 3-4/92: 233].

CALOW P., 1989. **The choise and implementation of environmental bioassays.** *Hydrobiologia, 188/189: 61-64*. [BA 6/92: 236].

MUNAWAR M. *et al.*, 1989. **A sensitive screening bioassay technique for the toxicological assessment of small quantities of contaminated bottom or suspended sediments.** *Hydrobiologia, 176/177: 497-507*. [BA 6/92: 237].

LEWIS M.A., 1991. **Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment.** *Water Research, 25: 101-113*. [BA 1/93: 251].

HALL W.S. *et al.*, 1991. **Acute toxicity of wastewater treatment polymers to *Daphnia pulex* and the fathead minnows (*Pimephales promelas*) and the effects of humic acid in polymer toxicity.** *Research J. WPCF, 63: 895-899*. [BA 1/93: 252].

MUNZINGER A., 1990. **Effects of nickel on *Daphnia magna* during chronic exposure and alterations in the toxicity to generations pre-exposed to nickel.** *Water Research, 24: 845-852*. [BA 1/93: 253].

PARKHURST B.R. *et al.*, 1991. **Water-quality-based approach to toxic control.** *Water Environ. & Technol., 3 (12): 45-47*. [BA 1/93: 254].

THOMAS V.F. *et al.*, 1992. **IBE. Indici biologici di esposizione per il 90-91.** *Giorn. Igienisti Ind., 17 (1): 61-73*. [BA 5/93: 279].

VAN DER HOEVEN, 1991. **LC50 estimates and their confidence**

intervals derived for tests with only one concentration with partial effect. *Water Research, 25, 401-408*. [BA 1/94: 290].

COMBER M.H.I. *et al.*, 1993. **The effects of nonylphenol on *Daphnia magna*.** *Water Research, 27, 273-276*. [BA 1/94: 291].

LUDYANSKIY M.L. *et al.*, 1992. **A system for water toxicity estimation.** *Water Research, 26, 689-694*. [BA 1/94: 292].

MINGAZZINI M., 1993. **Comparison of different methods for quantitative toxicity measurements on natural waters using *S. capricornutum*.** *Water Research, 27, 1055-1062*. [BA 3-4/94: 309].

LEE K.S. *et al.*, 1993. **Effects of dissolved humic materials on acute toxicity of some organic chemicals to aquatic organisms.** *Water Research, 27, 9-204*. [BA 3-4/94: 310].

MCCAHON C.P. *et al.*, 1991. **Lethal and sub-lethal toxicity of field simulated farm waste episodes to several freshwater invertebrate species.** *Wat. Res., 25 (6): 661-671*. [BA 3-4/94: 311].

WAGNER C. *et al.*, 1991. **Estimation of ecotoxicological protection levels from NOEC toxicity data.** *Water Research, 25, 1237-1242*. [BA 5/94: 323].

VIGANÒ L., 1993. **Reproductive strategy of *Daphnia magna* and toxicity of organic compounds.** *Water Research, 27, 903-909*. [BA 5/94: 324].

EASTERLY C. *et al.*, 1993. **Biotesting wastewater for hazard evaluation.** *Water Research, 27, 1145-1152*. [BA 5/94: 325].

NAIR S. *et al.*, 1992. **Differential sensitivity of pigmented and non-pigmented marine bacteria to metals and antibiotics.** *Water Research, 26, 431-434*. [BA 1/95: 331].

GUZZELLA L. *et al.*, 1992. **Metodi biologici per la valutazione del rischio da microinquinanti organici in ambienti acquatici.** *Atti V Congr. SItE, Milano, 21-25 sett. 92: 643-646*. [BA 2/95: 340].

GOODRICH M.S. *et al.*, 1991. **The toxicity, bioaccumulation, metabolism and elimination of dioctyl sodium solfosuccinate DSS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Wat. Res, 25 (2): 119-124*. [BA 2/95: 341].

DUTKA B.J. *et al.*, 1998. **Use of microbial and toxicant screening test for priority site selection of degraded areas in water bodies.** *Wat. Res., 22 (4): 503-510*. [BA 2/95: 342].

Varie

PAVAN G., 1989. **La bioacustica e l'ambiente acquatico.** *Acqua-Aria, 5: 573-580*. [BA 5/89: 114].

BARBERIS R. *et al.*, 1990. **Criteri per la valutazione della qualità dei compost. I: Parametri Chimici.** *Acqua-Aria, 2: 157-164*. [BA 3-4/90: 145].

NAPPI P. *et al.*, 1990. **Criteri per la valutazione della qualità dei compost. II: Parametri Biologici.** *Acqua-Aria, 2: 261-268*. [BA 3-4/90: 146].

REIMER P., 1989. **Concentration of lead in aquatic macrophytes from Shoal Lake, Manitoba, Canada.** *Environ. Pollut., 56: 77-84*. [BA 6/90: 164].

MARSDEN M. W., 1989. **Lake restoration by reducing external phosphoros loading: the influence of sediment phosphorous release**. *Freshwater biology, 21: 139-162*. [BA 3-4/91: 192].

LASSINI P. *et al.*, 1989. **Recupero a verde forestale della discarica controllata di Carate Brianza.** *Acer, 5: 21-25*. [BA 2/91: 186].

BEZZI A. *et al.*, 1991. **Piante insetticide e pesticide. Prodotti naturali di origine vegetale attivi contro i parassiti delle piante coltivate.** *Erboristeria Domani, ottobre: 65-79*. [BA 6/91: 213].

IMHOFF K.R., 1990. **Alcune esperienze riguardo ai bacini artificiali e loro relazione con l'ambiente e la qualità dell'acqua.** *Ingegneria Sanitaria, XIX (2): 87-93*. [BA 6/91: 214].

CRISP D.T., 1990. **Simplified methods of estimating daily mean stream water temperature.** *Freshwater Biology, 23: 457-462*. [BA 6/91: 217].

SINGH U.P. *et al.*, 1989. **Computer modeling for water quality planning: a case study.** *J. WPCF, 61: 87-94*. [BA 1/93: 255].

MANIATIS K. *et al.*, 1992. **Risultati e prospettive per gli impianti di compostaggio realizzati come attività dimostrative della CEE.** *Acqua Aria, 10: 969-975*. [BA 1/93: 257].

MOSS B., 1990. **Engineering and biological approaches to the restoration from eutrophication of shallow lakes in which aquatic plant communities are important components.** *Hydrobiologia, 200/201: 367-377*. [BA 1/93: 250].

MOSELLO R. *et al.*, 1991. **Il recupero del Lago d'Orta.** *Le Scienze, 280, 38-47*. [BA 3-4/94: 315].

HESPANHOL I. *et al.*, 1994. **WHO guidelines and national standard for reuse and water quality.** *Water Research, 28, 119-124*. [BA 2/94: 303].

WERNER P., 1991. **Trattamento microbiologico dei terreni contaminati.** *RS-Rifiuti Solidi, V (2): 121-126*. [BA 5/94: 319].

LIU D. *et al.*, 1993. **Characterization of biofilm development on artificial substratum in natural water.** *Water Research, 27, 361-367*. [BA 2/95: 343].

DIACO L. *et al.*, 1993. **Adesione batterica e sviluppo di biofilm su superfici solide (I parte).** *Ing. Sanit.-amb., genn.-febbr: 31-43*. [BA 2/95: 346].

DIACO L. *et al.*, 1993. **Adesione batterica e sviluppo di biofilm su superfici solide (II parte).** *Ingegneria sanit-amb., mar-apr.: 77-89*. [BA 2/95: 347].

Blais J.F. *et al.*, 1992. **Indicator bacteria reduction in sewage sludge by a metal bioleaching process.** *Wat. Res.*, 26 (4): 487-

495. [BA 5/96: 372].

Uri N. D., 1991 **Detecting a trend in water quality.** *Res. J. Water Pollut. Control Fed.* 63, 868 - 872. [BA 5/96: 373].

Suzuki Y. *et al.*, 1992. **Existence of stable Fe(II) complex in oxic river water and its determination.** *Water Research,* 11, 1421-1424. [BA 5/96: 374].

Vegetazione riparia

KARR J.R. *et al.*, 1978. **Water resources and the land-water interface.** *Sc., 201: 229-234*. [BA 2/90: 125].

LOWRANCE R. *et al.*, 1984. **Riparian forests as nutrient filters in agricultural watersheds.** *BioSc., 34 (6): 374-377*. [BA 2/90: 126].

CAPORALI F., 1985. **Gli effetti della gestione agroforestale del territorio sul flusso di acqua e di elementi minerali.** *Atti Congr. S.I.T.E. 5: 127-130*. [BA 2/90: 127].

CAPORALI F., 1981. **Relazione tra uso del territorio e contenuti di azoto nelle acque superficiali di bacini agricoli e forestali della Toscana.** *S.I.T.E./ATTI 1: 109-116*. [BA 2/90: 128].

PINAY G. *et al.*, 1988. **The role of riparian woods in regulating nitrogen fluxes between the alluvial aquifer and surface water: a conceptual model.** *Regulated rivers: res. and manag. Vol. 2: 507-516*. [BA 2/90: 129].

PETERJOHN W.T. *et al.*, 1984. **Nutrient dynamics in an agricultural watershed: observations of the role of a riparian forest.** *Ecology, 65(5): 1466-1475*. [BA 2/90: 130].

JACOBS T.C. *et al.*, 1985. **Headwater streams losses of nitrogen from two costal plain watersheds.** *J. Environ. Qual., 14 (4)*. [BA 2/90: 131].

ZHOU QI. *et al.*, 1983. **The activity of nitrifying and denitrifying bacteria in paddy soil.** *Soil Sc. 135 (1): 31-34*. [BA 2/90: 132].

GUTHRIE T.F. *et al.*, 1978. **Nitrogen mineralization and denitrification in organic soils.** *Soil Sci. Soc. Am. J. 42: 908-912*. [BA 2/90: 133].

REDDY K.R. *et al.*, 1983. **Nitrogen and phosphorus fluxes from a flooded organic soil.** *Soil Sc. 136 (5): 300-307*. [BA 2/90: 134].

DECAMPS H. *et al.*, 1987. **The importance for birds of the riparian woodslands within the alluvional corridor of the River Garonne, S.W. France.** *Regulated Rivers: Res. and Manag., vol. 1: 301-316*. [BA 2/90: 135].

WARWICK J. *et al.*, 1988. **Nitrate depletion in the riparian zone of a small woodland stream.** *Hydrobiologia, 157: 231-240*. [BA 3-4/91: 197].

PINAY G. *et al.*, 1986. **Une station d'épuration naturelle des nitrates transportes par le nappes alluviales: l'aulnaie glutineuse**. *C.R. Acad. Sc. Paris, serie III, 302 (17)*. [BA 5/91: 209].

HISCOCK K.M. *et al.*, 1991. **Review of natural and artificial denitrification of groundwater.** *Water Research, 25: 1099-1111*. [BA 1/93: 256].

HAYCOCK N. E. *et al.*, 1993. **Groundwater nitrate dynamics in grass and poplar vegetated riparian buffer strips during the winter.** *J. of Environ. Quality, 22 (2): 273-278*. [BA 1/95: 335].

BRACCO F. *et al.*, 1993. **Vegetazione perifluviale: conservazione degli habitat e dei loro meccanismi genetici, l'esempio del Po in Lombardia.** *Acqua-Aria, (7): 761-765*. [BA 6/95: 352].